

dc\_27\_10

MTA Doktori Értekezés

**A REPRODUKCIÓT SZABÁLYOZÓ HIPOTALAMIKUS NEURONHÁLÓZAT  
MORFOLÓGIAI ÉS FUNKCIONÁLIS JELLEMZÉSE**

**Dr. Hrabovszky Erik**

MTA  
Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet  
Endokrin Neurobiológia Csoport

Budapest

2010

## TARTALOMJEGYZÉK

	OLDAL
<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b>	<b>3</b>
<b>I. BEVEZETÉS</b>	
I/1. A GONÁDMŰKÖDÉS SZABÁLYOZÁSA EMLŐSÖKBEN	4
I/2. A GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE (GnRH) NEURONRENDSZER ANATÓMIAI FELÉPÍTÉSE	4
I/3. A GnRH „PULZUS GENERÁTOR” ÉS SZABÁLYOZÁSA	5
I/4. NEGATÍV ÉS POZITÍV ÖSZTROGÉN VISSZACSATOLÁS HATÁSA A GnRH PULZUS GENERÁTOR MŰKÖDÉSÉRE	5
I/5. A PULZATILIS GnRH SZEKRÉCIÓT BEFOLYÁSOLÓ EGYÉB TÉNYEZŐK	6
I/6. ÖSZTROGÉN RECEPTOR- $\beta$ SZEREPE A HIPOTALAMIKUS MŰKÖDÉSEKBEN	6
I/7. NEUROTRANSMITTEREK/NEUROMODULÁTOROK JELENTŐSÉGE A GnRH NEURONMŰKÖDÉS AFFERENS SZABÁLYOZÁSÁBAN	7
I/8. GLUTAMÁTERG HATÁSOK A REPRODUKTÍV TENGYELY KÜLÖNBÖZŐ SZINTJEIN	11
I/9. AGYI ÖSZTROGÉN SZIGNALIZÁCIÓ ÉLETTANA ÉS VÁLTOZÁSAI MENOPAUZÁBAN	12
<b>II. CÉLKITÚZÉSEK</b>	<b>13</b>
<b>III. MÓDSZEREK</b>	
III/1. KÍSÉRLETI ÁLLATOK	14
III/2. MŰTÉTEK, KEZELÉSEK	14
III/3. SZÖVETTANI METSZETEK	15
III/4. FÉNY- ÉS ELEKTRONMIKROSKÓPOS IMMUNCITOKÉMIA	15
III/5. <i>IN SITU</i> HIBRIDIZÁCIÓ	16
III/6. MICROARRAY VIZSGÁLATOK	18
III/7. RT-qPCR ÉS TAQMAN ARRAY MÓDSZEREK	18
III/8. <i>IN VITRO</i> SZELET ELEKTROFIZIOLÓGIA	18
<b>IV. EREDMÉNYEK</b>	
IV/1. GnRH NEURONOK AFFERENS SZABÁLYOZÁSÁT VÉGZŐ NEUROTRANSMITTER RENDSZEREK AZONOSÍTÁSA	19
IV/2. DIREKT ÖSZTROGÉN VISSZACSATOLÁS IGAZOLÁSA GnRH NEURONOKBAN: A “ $\beta$ ” TÍPUSÚ ÖSZTROGÉN RECEPTOR SZEREPE	23
IV/3. GLUTAMÁTERG (VGLUT2) FENOTÍPUS MEGJELENÍTÉSE GnRH NEURONOKBAN ÉS TOVÁBBI NEUROSZEKRETOROS RENDSZEREKBEN	27
IV/4. 17 $\beta$ -ÖSZTRADIOL KÖTÉSÉT KÖVETŐ TRANSZKRIPCIÓS VÁLASZOK AZONOSÍTÁSA A FRONTÁLIS AGYKÉREGBEN	31
<b>V. ÖSSZEFOGLALÁS</b>	<b>32</b>
<b>VI. IRODALOM</b>	
VI/1. AZ ÉRTEKEZÉS ÁLTALÁNOS IRODALOMJEGYZÉKE	33
VI/2. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	43
VI/3. A PHD FOKOZAT MEGSZERZÉSE ÓTA MEGJELENT EGYÉB SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	44
VI/4. SZCIENTOMETRIAI ADATOK	45
<b>VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	<b>45</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2-AG	2-arachidonoyl-glycerol
ARC	nucleus arcuatus hypothalami
CB1, CB2	1. és 2. típusú kannabinoid receptor
cDNS	komplementer dezoxiribonukleinsav
CRH	corticotropin-releasing hormone
cRNS	komplementer ribonukleinsav
DAB	diaminobenzidin
DBH	dopamin- $\beta$ -hidroxiláz
EM	eminentia mediana
ER- $\alpha$	“ $\alpha$ ” ösztrogén receptor
ER- $\beta$	“ $\beta$ ” ösztrogén receptor
E2	17 $\beta$ -ösztadiol
FSH	follikulus stimuláló hormon
GABA	gamma-amino vajsav
GFP	zöld fluoreszcens protein
GHRH	growth hormone-releasing hormone
GnRH	gonadotropin-releasing hormone
GPR54	G-protein kapcsolt receptor 54
IR	immunreaktív
LH	luteinizáló hormon
MPOA	mediális preoptikus area
mRNS	messenger ribonukleinsav
Ni-DAB	nikkel-diaminobenzidin
NK3	neurokinin-3 receptor
NPY	neuropeptide Y
OT	oxitocin
OVL	organum vasculosum laminae terminalis
PCR	polimeráz láncreakció
PVN	nucleus paraventricularis hypothalami
RP3V	A III. agykamra rostrális periventrikuláris területe
RT-qPCR	Valós-idejű kvantitatív PCR
SON	nucleus supraopticus hypothalami
SSC	„standard saline citrate solution” (1XSSC=0,15 M NaCl/15 mM Na-citrát; pH 7,0)
THC	$\Delta$ 9-tetrahidrokannabinol
TRH	thyrotropin-releasing hormone
VGLUT1-3	1-3. típusú vezikuláris glutamát transzporterek
VP	vazopresszin

## I. BEVEZETÉS

### I/1. A gonádműködés szabályozása emlősökben

Valamennyi emlős faj szaporodásában meghatározó szerepet játszik a reprodukív tengely hierarchikusan egymásra épülő három fő szintje, a hipotalamusz, az adenohipofízis és a gonádok közt működő összetett kölcsönhatás. A hipotalamusz kimeneti jelét az adenohipofízis számára a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) - másik elfogadott nevén: luteinizáló hormone-releasing hormone (LHRH) - neuroszekretoros rendszer biztosítja, mely neurohormon tartalmát 30-90 percenként jelentkező szekréciós pulzusok formájában üríti a hipofízis portális keringési rendszerébe (Krsmanovic *et al.*, ; Knobil, 1980; Krsmanovic *et al.*, 1996; Terasawa, 1998; Moenter *et al.*, 2003). A GnRH hatására az adenohipofízisből elválasztott két gonadotrop hormon, a follikulus stimuláló hormon (FSH) és a luteinizáló hormon (LH) a gonádok gametogenezisét illetve szteroid hormon termelését irányítja. A reprodukív tengely működésének egy lényeges vonása, hogy a gonádokban folyó szteroid hormon termelés és gametogenezis szabályozottságát a hipotalamusz és a hipofízis szintjén ható visszacsatolási mechanizmusok biztosítják (Karsch & Foster, 1975; Knobil, 1980; Herbison, 1998). A gonádokban termelt szteroid hormonok - specifikus hormon receptoraik közvetítésével – egyúttal számos fontos élettani hatást gyakorolnak csaknem valamennyi szerv, köztük a központi idegrendszer működésére.

### I/2. A gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronrendszer anatómiai felépítése

A GnRH idegsejtek az orrplakodból fejlődnek. Egérben a prenatális 11. napon kezdik meg vándorlásukat az orrsövény mentén a bazális előagy felé (Wray *et al.*, 1989; Schwanzel-Fukuda & Pfaff, 1990). A fejlődő szaglórendszerrel alkotott szoros kapcsolat miatt, a migrációs folyamat zavarai anozmiával járó hipogonadotrop hipogonadizmust okozhatnak, melyet a hipotalamikus GnRH idegsejtek hiánya jellemez. A különböző genetikai hátterű humán kórképek gyűjtőneve Kallmann szindróma (Seminara *et al.*, 2000).

Születés idejére a GnRH idegsejtek perikaryonjai megérkeznek a preoptikus/hipotalamikus területekre. A rendkívül kisszámú (1000-1500) GnRH neuron egérben és patkányban laza csoportokban, főképp a Broca-féle diagonális köteg, a mediális septum, a mediális preoptikus area (MPOA), az organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) és a medián preoptikus mag területén helyezkedik el (Merchenthaler *et al.*, 1980). Emberben megoszlásuk még kevésbé kompakt. Jelentős számú sejtestest található a hátsó hipotalamusz, így a nucleus infundibularis (=arcuatus; ARC) területén is (Rance *et al.*, 1994). A meglehetősen diffúz megoszlás miatt, a GnRH perikaryonok topográfiai viszonyaira történő hivatkozáskor egyszerűsített anatómiai nomenklaturát használunk.

A GnRH neuronok fő projekciós helyeit az OVLT, továbbá az eminentia mediana (EM) külső zónájának vér-agy gát-mentes területei jelentik (Wray *et al.*, 1989; Schwanzel-Fukuda & Pfaff, 1990). Az EM egyúttal a hipofízis portális keringési rendszerébe történő GnRH neuroszekréció fő helye. A kevésbé tanulmányozott, extrahipotalamikus axonvetületek ugyanakkor elérik a középagyi periakveduktális szürkeállományt és a mediális amygdalát (Liposits & Setalo, 1980; Merchenthaler *et al.*, 1989).

Az alaktanilag bipoláris, emberben kisebb részben multipoláris (Rance *et al.*, 1994) GnRH idegsejtek anatómiai és funkcionális hálózatot alkotnak. Köztük kommunikáció jöhet létre valódi szinaptikus kapcsolatok útján (Witkin & Silverman, 1985). A GnRH-t szekretáló, immortalizált GT1-7 sejtek szinaptoid valamint tight junction típusú kapcsolatokat létesítenek egymással (Liposits *et al.*, 1991), egyúttal termelnek gap junction fehérjéket is (Matesic *et al.*, 1993). A GnRH idegsejtek közt megfigyelt egyik érdekes kapcsolati típust olyan folytonos citoplazma hidak jelentik, melyekből a GnRH idegsejteket elválasztó sejtmembrán hiányzik (Witkin, 1999). Végül a GnRH neuronok axonjai az OVLT és az EM területén

szinaptikus specializáció nélküli kötegeket hoznak létre, ezáltal a terminálisok közötti parakrin kommunikáció anatómiai alapjait teremtve meg (Lehman & Silverman, 1988).

A GnRH idegsejtek egymással alkotott kapcsolatai mellett, a szinkronizált szekréciónak működés szabályozásában kulcsfontosságú szerepet játszanak a számos forrásból érkező szinaptikus bemenetek is (Herbison, 1998), melyeket az I/7. fejezetben, külön tárgyalunk.

### **I/3. A GnRH „pulzus generátor” és szabályozása**

A fent vázolt kapcsolatrendszer „GnRH pulzus generátorként” működik (Knobil, 1990), mely az EM vér-agy gát-mentes külső zónájában végződő GnRH axonvetületek 30-90 percenként jelentkező, koordinált szekréciónak aktivitását eredményezi. A szinkronizált neuroszekréció hátterében az egyedi GnRH idegsejtek kalcium tranzienseinek egyidejű megjelenése áll (Terasawa, 1998). A pulzatilis GnRH elválasztás a hipofízis gonadotrop sejtjeinek pulzatilis aktiválását és ezáltal, pulzusokban történő LH és FSH termelését illetve szekréciónak hozza létre. Egyúttal meggátolja a hipofízis GnRH receptorainak deszenzitizációját, mely ligandum folyamatos jelenlétében következne be (Belchetz *et al.*, 1978; Catt *et al.*, 1985; Limonta *et al.*, 2001). A GnRH szekréciónak pulzusok mintázata fontos kódot hordoz az adenohipofízis gonadotrop sejtjei számára. A ciklus follikuláris fázisára jellemző, alacsony frekvenciájú GnRH elválasztás elsősorban az FSH $\beta$  alegység átírását és az FSH szekréciónak stimulálja. A preovulatórikus GnRH hiperszekréció („surge”) idején jellemző, frekvensebb pulzusok ezzel szemben az LH $\beta$  alegység átírását fokozzák és előidéznek az ovulációt közvetlenül kiváltó LH hiperszekréciónak („LH surge”) (Wildt *et al.*, 1981; Dalkin *et al.*, 1989; Marshall & Griffin, 1993; Burger *et al.*, 2002; Counis *et al.*, 2005).

A GnRH pulzatilis szekréciója már olyan egyszerű modellrendszerben is megfigyelhető, mint a GnRH-t szekretáló, immortalizált GT1-7 sejtvonala (Wetsel *et al.*, 1992). *In vivo* azonban a pulzus generátor működése jóval bonyolultabb, és a végső szekréciónak mintázat kialakításához számos tényező hozzájárul. A szervezetnek a környezetével alkotott kapcsolatát és belső állapotát tükröző endokrin-, metabolikus-, cirkadián-, szezonális-, stressz- és egyéb szignálok a pulzatilis GnRH szekréció megváltoztatásával befolyásolják a fertilitást. Ezért a GnRH pulzus generátor szabályozásának megértése a reprodukív neuroendokrinológia egyik fontos feladata.

### **I/4. Negatív és pozitív ösztrogén visszacsatolás hatása a GnRH pulzus generátor működésére**

Hím állatokban a herében termelt tesztoszteron és az abból aromatizációval keletkező 17 $\beta$ -ösztradiol (E2), androgén ill. ösztrogén receptorokon hatva, folyamatos gátló hatást gyakorol a GnRH pulzus generátor működésére. Nőstényekben a petefészekből származó ösztrogének (elsősorban az E2) negatív visszacsatolása szintén fékezi a GnRH pulzus generátort és az LH szekréciónak az ovariális ciklus nagy részében. Ezt spontán ovuláló fajokban a ciklus közepén (laboratóriumi rágcsálókban a proösztrozus délutánján) jelentkező, pozitív ösztrogén visszacsatolás szakítja meg (Moenter *et al.*, 2009), mikor a GnRH szekréciónak pulzusok frekvenciája és az időegység alatt ürülő GnRH mennyisége egyaránt megnő („GnRH surge”) (Sarkar *et al.*, 1976; Moenter *et al.*, 1990; Pau *et al.*, 1993). Ezzel párhuzamosan, az adenohipofízis gonadotrop sejtjeinek válaszkészsége GnRH-ra szintén fokozódik (Aiyer *et al.*, 1974; Adams *et al.*, 1981). A magas E2 szint hatására bekövetkező GnRH surge - a portális keringési rendszer közvetítésével - a hipofízisben LH surge-öt okoz, ami a petefészekben kiváltja az ovulációt.

Az E2 központi idegrendszeri hatásainak közvetítésében fontos szerepet tölt be a két ösztrogén receptor típus (ER- $\alpha$  és ER- $\beta$ ), melyek ligand-függő transzkripciós faktorokként, promotor régiók ösztrogén-válasz eleméhez kötve befolyásolják az ösztrogén-függő gének átírását. A fenti, klasszikus genomiális hatáson kívül, újabban az érdeklődés homlokterébe

kerültek az ösztrogének nem-genomiális, gyors hatásai is (Genazzani *et al.*, 2005). Az ösztrogén hormonok a GnRH idegsejt működésének számos aspektusát befolyásolják. Ilyen a GnRH bioszintézise és lebontása, a GnRH neuronok galanin termelése, elektromos aktivitása vagy pulztilis GnRH szekréciója (Herbison, 1998; Christian *et al.*, 2008; Moenter *et al.*, 2009).

Mióta Shivers és mtsai 1983-ban publikálták, hogy a GnRH idegsejtek a tríciummal megjelölt E2-t nem képesek felvenni (Shivers *et al.*, 1983), széles körben elfogadott az a nézet, miszerint az ösztrogén visszacsatolás GnRH idegsejtek felé kizárólag E2-érzékeny interneuronok közvetítésével jöhet létre. Három évtizedes kutatómunka eredményeképp mára körvonalazódott (Herbison, 2008), hogy a pozitív ösztrogén visszacsatolás szempontjából rágsálókban kitüntetett jelentőséggel bír a III. agykamra rosztrális periventrikuláris területe (RP3V). Az RP3V kisszeptint termelő sejtszoptja tartalmazza az ER- $\alpha$ -t (Franceschini *et al.*, 2006), beidegzi a GnRH idegsejteket (Clarkson & Herbison, 2006), aktiválódik az LH surge idején (Irwig *et al.*, 2004) és kisszeptin termelése E2 hatására nő (Oakley *et al.*, 2009). A negatív ösztrogén visszacsatolás egyik régóta feltételezett helye rágsálókban az ARC (Herbison, 1998). Egy ARC-ban található, és kisszeptint termelő sejtszopt szintén tartalmaz ER- $\alpha$ -t (Franceschini *et al.*, 2006). Az RP3V kisszeptin sejtjeitől eltérően, az ARC kisszeptin expressziója negatív ösztrogén szabályozás alatt áll (Oakley *et al.*, 2009). Főemlősökben az RP3V-vel analóg magot még nem sikerült megfigyelni. A jelenleg elfogadott nézet szerint, mind a pozitív, mind a negatív ösztrogén visszacsatolásban a nucleus infundibularis (=ARC) játssza a fő szerepet (Knobil, 1980).

#### **I/5. A pulztilis GnRH szekréciót befolyásoló egyéb tényezők**

Az ösztrogén-függőség mellett, a GnRH szekréciót a cirkadián ritmus (Christian *et al.*, 2005) is jellemzi. Ennek következménye, hogy patkányban és egérben a preovulatórikus LH surge mindig a proösztrozus délutánján, a nappali fény megszűnése előtti órákban jelentkezik. A cirkadián hatás közvetítésében szerepet játszó, egyik több-neuronos pálya magában foglalja a retino-hipotalamikus köteget, a nucleus suprachiasmaticus vazopresszin (VP) idegsejtjeit, valamint az RP3V GnRH idegsejteket beidegző kisszeptin neuronjait (Vida *et al.*, 2010).

A napszakok hosszának eltolódása a melatonin termelésén keresztül képes szabályozni a reprodukció éves ciklusát szezonális szaporodást mutató fajokban (Revel *et al.*, 2009).

Elégtelen táplálékfelvétel (Sullivan *et al.*, 2003) vagy túlhajtott sport (De Cree, 1998) miatt bekövetkező leptin hiány a pulztilis GnRH és LH szekréciót megszünteti. A metabolikus eredetű anovuláció jellemző klinikai példája az anorexia nervosa (Miller & Golden). A metabolikus hatások közvetítésében fontos szerepe lehet az ARC leptin receptort tartalmazó idegsejtjeinek. A neuropeptide Y (NPY)-t és agouti-related protein (AGRP)-t termelő, ARC-ból eredő, leptin-érzékeny pálya hozzájárulását a GnRH idegsejtek gátló szabályozásához egyik tanulmányunk vizsgálja (5).

Az endokrin rendszer és az anyagcsere egyéb rendellenességeivel, mint a stresszel (Berga & Loucks, 2005)-, a pajzsmirigyműködés zavaaraival (Koutras, 1997)- vagy a diabetes mellitussal (Livshits & Seidman, 2009) kapcsolatos infertilitás a pulzus generátor sérülékenységet jelzi. A kórképek részletezése az értekezés témakörét meghaladná.

#### **I/6. Ösztrogén receptor- $\beta$ szerepe a hipotalamikus működésekben**

Kuiper és mtsai 1996-ban klónozták az ER- $\beta$  receptor típust prosztatából (Kuiper *et al.*, 1996). Az ER- $\beta$  topográfiai megoszlása rágsálók agyában a klasszikus ER- $\alpha$  receptorétól feltűnően eltért (Shughrue *et al.*, 1996; Shughrue *et al.*, 1997). A második ösztrogén receptor típus felfedezésével részben már megmagyarázhatóvá vált a nucleus paraventricularis (PVN) és a nucleus supraopticus (SON) magnocelluláris neuroszekretoros idegsejtjeinek E2 általi

szabályozása is. Ezek a neuronok patkányban ER- $\alpha$ -t nem tartalmaznak (Simerly *et al.*, 1990), miközben a hipotalamikus oxitocin (OT) és VP messenger ribonukleinsav (mRNS) expresszió (Van Tol *et al.*, 1988) és peptid szint (Jirikowski *et al.*, 1988), a szérum (Skowsky *et al.*, 1979) és a hipofízis (Van Tol *et al.*, 1988) OT és VP tartalma, a dendritikus OT ürítés (Wang *et al.*, 1995), vagy az OT idegsejtek elektromos aktivitása (Negoro *et al.*, 1973) ismert ösztrogén-függést mutatnak. Immuncitokémiát és *in situ* hibridizációt ötvöző korábbi munkánkban valóban sikerült is igazolni az ER- $\beta$  előfordulását az OT-t és VP-t termelő hipotalamikus neuronok egyes populációiban (Hrabovszky *et al.*, 1998). Mivel a receptor expresszió egyenetlenül oszlott meg az anatómiailag és funkcionálisan is heterogén sejtcsoportok között, az értekezésben szereplő egyik munkánk az ER- $\beta$  tartalmú hipotalamikus OT és VP idegsejtek finomabb topográfiai analízisét tűzte ki célul (6). Ugyanezen tanulmányban vizsgáltuk a kolokalizációs jelenséget a humán hipotalamusz OT és VP sejtjeinek vonatkozásában is (6).

A GnRH idegsejtekre gyakorolt pozitív és negatív ösztrogén visszacsatolás (Herbison, 1998) lényegének megértése kezdettől fogva a reprodukív neuroendokrinológia központi kérdése. Mióta Shivers és munkatársai megfigyelték a tríciummal megjelölt E2 *in vivo* felvételének hiányát patkány GnRH neuronjaiban (Shivers *et al.*, 1983), majd ezt követően mások az ER- $\alpha$  hiányát immuncitokémiával is alátámasztották (Herbison & Theodosis, 1992; Lehman & Karsch, 1993), a kutatások középpontjába az E2 hatásait közvetítő, ösztrogén-érzékeny interneuronok azonosítása került. Értekezésem egy része az ilyen indirekt ösztrogén hatásokban szerepet játszó rendszerekkel (hisztamin, kisspeptin, neurokinin B) foglalkozik (1, 21). Az ER- $\beta$  felfedezését és hipotalamikus megoszlásának leírását követően azonban ismét felmerült a GnRH idegsejtek direkt E2 érzékenysége kérdése. Ösztrogén visszacsatolással kapcsolatos, értekezésben szereplő vizsgálataink az ER- $\beta$ -n keresztül gyakorolt, közvetlen ösztrogén visszacsatolás lehetőségét is vizsgálják rágszálókban és emberben (2, 3, 15, 18).

#### **I/7. Neurotranszmitterek/neuromodulátorok jelentősége a GnRH neuronműködés afferens szabályozásában**

A GnRH pulzus generátor működését módosító hatások (I/4. és I/5. fejezetek) jelentős része idegi afferensek útján éri a GnRH idegsejteket (Herbison, 1998). Alább ezek jelentősebb átvivőanyagait tárgyaljuk röviden.

A gamma-amino vajsav (GABA) a GnRH idegsejtek afferenseinek legfontosabb átvivőanyaga. A GnRH idegsejteken kimutatható szinaptikus végződés jelentős része GABAerg (Leranth *et al.*, 1985). A GnRH idegsejtek mind GABA<sub>A</sub> (Petersen & McCrone, 1994), mind GABA<sub>B</sub> (Zhang *et al.*, 2009) receptorokkal rendelkeznek. A GnRH neuronok sajátos klorid homeosztázisának tudható be, hogy a GABA a GnRH idegsejteket GABA<sub>A</sub> receptorokon keresztül depolarizálja (DeFazio *et al.*, 2002). Elektrofiziológiai munkákból ismert, hogy a GABAerg afferens szabályozás egyaránt fontos a metabolikus (Sullivan *et al.*, 2003)-, ösztrogén (Christian *et al.*, 2005)-, és cirkadián (Christian *et al.*, 2005) szignálok közvetítésében. Mivel a GnRH neuronokat a glutamáton kívül a GABA is serkenti (DeFazio *et al.*, 2002), a serkentő GABAerg bemenetek endokannabinoid érzékenysége különös jelentősége lehet a GnRH neuronhálózat gátló szabályozásában. Ezt az értekezés keretein belül vizsgáljuk (23).

A fő serkentő neurotranszmitter, az L-glutamát is megtalálható a GnRH idegsejteket beidegző axonokban (Kiss *et al.*, 2003). Mivel a szinapszisok többsége nagy valószínűséggel a GnRH dendritfa szómától távoli elágazódásaira érkezik, a glutamáterg bemenet jelentőségét az afferens szabályozásban whole-cell patch-clamp elektrofiziológiai vizsgálatokkal nehéz megítélni. Míg GABA<sub>A</sub> receptor-mediált miniatűr poszt-szinaptikus áramokat valamennyi GnRH idegsejtben ki lehet mutatni, excitatórikus poszt-szinaptikus áramok a neuronok 25-

30%-ában nem mérhetőek (Christian *et al.*, 2009). A reprodukív tengely alsóbb szintjein ható, nem-szinaptikus glutamaterg hatások vizsgálata az értekezés célkitűzései között szerepel (7-12, 14, 17, 20). Ezeket a bevezetés külön pontjában (1.8) vesszük sorra.

Az agytörzsi noradrenalin is fontos szerepet tölt be a GnRH neuronok fiziológiás szabályozásában. Ennek megfelelően, patkányokban az LH surge létrejötte  $\alpha$ -adrenerg antagonistákkal vagy a felszálló katekolaminerg pályák átmetszésével meggátolható (Clifton & Sawyer, 1979; Coen & Coombs, 1983). Közvetlenül a surge-öt megelőzően, az agytörzsi A2 noradrenerg sejtszövetben megjelenik az aktivitást jelző c-Fos (Jennes *et al.*, 1992). Nem ismert ugyanakkor, hogy a GnRH idegsejtek direkt noradrenerg beidegzése milyen mértékű. Az értekezés egy részében a neuropeptide Y (NPY)-t is tartalmazó, felszálló noradrenerg/adrenerg pályák GnRH neuronokkal képzett direkt kapcsolatát vizsgáljuk (5).

A GnRH pulzus generátor működésére ható további klasszikus idegi átvivőanyag és neuropeptidek közül (dopamin, opioid peptidek, neurotensin, P anyag, dinorfin, stb.) (Herbison, 1998) a továbbiakban csak az értekezésben szereplőket tárgyaljuk.

#### Hisztamin (1)

A reprodukív neuroendokrinológia egyik legizgalmasabb kérdés az E2 pozitív és negatív visszacsatolásának mechanizmusai jelentik. Az E2 indirekt hatásait közvetítő idegsejtek ösztrogén receptorral rendelkeznek, GnRH neuronokkal idegi kapcsolatban állnak és szelektív transzmitter receptorokon keresztül kommunikálnak (Herbison, 1998; Petersen *et al.*, 2003). A hisztamin ösztrogén visszacsatolásban játszott szerepe számos korábbi tanulmány alapján felvethető. Így, az E2 hisztamin elválasztást képes kiváltani hipotalamikuszöveti blokkból *in vitro* (Ohtsuka *et al.*, 1989), hisztaminerg axonok bőségesen beidegzik a GnRH idegsejteket is tartalmazó optikus areát (Panula *et al.*, 1989), az agykamrába juttatott hisztamin nyulakban ovulációt vált ki (Sawyer, 1955), és a GnRH-t szekretáló GT1 sejtvonal H1 hisztamin receptort expresszál (Noris *et al.*, 1995). Több nyitott kérdés maradt azonban a hisztamin szerepével kapcsolatban. Tisztázatlan, hogy a tuberomammilláris mag hisztaminerg neuronjai rendelkeznek-e ösztrogén receptorral, innerválják-e közvetlenül a GnRH idegsejteket, továbbá részt vesznek-e, és mely hisztamin receptor közvetítésével, a pozitív ösztrogén visszacsatolásban.

#### NPY (5)

A 36 aminosavból álló NPY a hipofízis és a központi idegrendszer területén hatva egyaránt fontos szerepet játszik a gonadális tengely befolyásolásában (Kalra & Crowley, 1992). Az NPY egyik központi idegrendszeri támadáspontja az OVLT és az MPOA. Az itt található, GnRH-t termelő idegsejtek perikaryonja expresszálja az Y5 receptor típust (Campbell *et al.*, 2001), és bőséges NPY-immunreaktív (IR) beidegzést nyer (Tsuruo *et al.*, 1990). Az innervációban résztvevő, NPY tartalmú axonok egyik valószínű forrása az ARC. Ennek megfelelően, az ARC léziója az MPOA NPY-IR rostjainak jelentős számbeli csökkenését okozza (Broberger *et al.*, 1998). Anterográdjelölőanyag bejuttatása az ARC területére valóban igazolja is egy ARC-ból eredő, GnRH neuronokat beidegző NPY tartalmú pálya létezését (Li *et al.*, 1999). Ennek ösztrogén visszacsatolásban játszott szerepére utalhat, hogy az ARC NPY neuronjainak 10%-a tartalmaz ösztrogén receptort (Kalra & Crowley, 1992), és a mag NPY mRNS tartalma a proösztrozus delutánján bekövetkező LH surge idején megnő (Bauer-Dantoin *et al.*, 1992). Az ARC NPY idegsejtjei leptin receptort is tartalmaznak (Baskin *et al.*, 1999), és fontos metabolikus hatásokat közvetíthetnek a reprodukív tengely felé. Az ARC NPY neuronjainak közel 100%-a tartalmaz egy másik peptidet, AGRP-t is (Broberger *et al.*, 1998). Az NPY-hoz hasonlóan, táplálékfelvételt fokozó hatású AGRP kizárólag az ARC-ban szintetizálódik. Így, immunfluoreszcens megjelenítése NPY-IR idegrostokban azok ARC-beli eredetét is jelzi. A GnRH idegsejtek beidegzésében résztvevő NPY idegrostok egy további valószínű forrása az agytörzs, ahol az NPY noradrenerg és adrenerg idegsejtekben fordul elő (Everitt *et al.*, 1984; Sawchenko *et al.*, 1985). A felszálló



agytörzsi NPY vetületek így a noradrenerg marker enzim, a dopamin- $\beta$ -hidroxiláz (DBH) jelenlétével jellemezhetőek. A fenti két fő NPY rendszeren kívül, NPY tartalmú idegsejtek számos egyéb anatómiai lokalizációban, így a hipotalamusz dorzomediális magjában, a stria terminalis magjában, a laterális preoptikus area-ban, a dorzális hipotalamikus area-ban, a középagy központi szürkeállományában és a commissura anterior körül is megfigyelhetőek (Chronwall *et al.*, 1985). Nem tudott, hogy az anatómiailag és funkcionálisan heterogén NPY idegsejtek milyen mértékben járulnak hozzá a GnRH neuronrendszer beidegzéséhez.

#### Acetilkolin (16)

Míg az acetilkolin önmagában az adenohipofízis szintjén nem hat a gonadotrop hormon szekrécióra (Simonovic *et al.*, 1974), a központi idegrendszer területén a reprodukció számos aspektusát képes befolyásolni (Everett, 1964). Így, a muszkarinerg receptor antagonistátrópin gátolja mind a spontán, mind a reflexes ovulációt (Everett, 1964). A patkány laterális hipotalamuszába ültetett atropin implantátum megnyújtja az ovariális ciklus diösztrusz fázisát (Benedetti *et al.*, 1969). Ezentúl, a mediobazális hipotalamuszból acetilkolinnal GnRH szekréció váltható ki *in vitro*, mely gátolható a nikotinerg receptor antagonistátrópin hexamethoniummal (Richardson *et al.*, 1982). Irodalmi adat a GnRH idegsejtek közvetlen kolinerg beidegzésére vonatkozó nem áll rendelkezésre.

#### Kisspeptin (21)

Reproduktív neuroendokrinológia területén az utóbbi évtizedek kétségtelenül legnagyobb jelentőségű felismerése a kisspeptin/G-protein kapcsolt receptor 54 (GPR54) szignalizációs rendszer szerepére vonatkozott. A GPR54 gén inaktiváló mutációi emberben hipogonadotrop hipogonadizmust (de Roux *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003; Semple *et al.*, 2005), míg aktiváló mutációi centrális eredetű pubertas praecoxot okoznak (Teles *et al.*, 2008). A receptor természetes liganduma az (emberben) 54 aminosavas kisspeptin-54 (másik nevén metastin), mely a *KISS1* gén terméke. Különböző emlős fajokban a kisspeptinek – a kisspeptin-54 és rövidebb, biológiailag ugyancsak aktív C-terminális fragmentumai – erőteljesen serkentik az LH szekrécióját *in vivo*. A kisspeptin támadáspontja centrális, és hatása GnRH antagonistátrópin előkezeléssel kivédhető (Gottsch *et al.*, 2004; Shahab *et al.*, 2005). A kisspeptint termelő neuronok GnRH idegsejtekre gyakorolt közvetlen hatását mutatja kisspeptin-IR kontaktusok jelenléte GnRH-IR sejtesteken és dendritiken (Kinoshita *et al.*, 2005; Clarkson & Herbison, 2006), a GPR54 mRNS expressziója GnRH neuronokban (Irwig *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2005), c-Fos immunreaktivitás megjelenése kisspeptin adását követően GnRH idegsejtek magjában (Irwig *et al.*, 2004), valamint a GnRH-GFP idegsejtek kisspeptin okozta depolarizációja akut szelet-preparátumban (Dumalska *et al.*, 2008; Pielecka-Fortuna *et al.*, 2008). A kisspeptin rendszer neuroanatómiai viszonyaira vonatkozó ismereteink főképp rágcslókon tett megfigyeléseken alapulnak. Rágcsló fajokban a kisspeptint két jól elkülönülő sejtcsoport termeli, a III. agykamra rostrális periventrális területén (RP3V), valamint az ARC-ban (Clarkson & Herbison, 2006). Az előbbi terület kisspeptin neuronjainak száma nőstény egérben és patkányban jelentősen meghaladja a hímeiben megfigyelhető sejtszámot (Clarkson & Herbison, 2006; Kauffman *et al.*, 2007). Egyre elfogadottabb, hogy rágcsló fajokban az RP3V szexuálisan dimorf és ösztrogén érzékeny kisspeptin idegsejtcsoportja lényegesen hozzájárul a GnRH idegsejtek beidegzéséhez és nőstényekben a pozitív ösztrogén visszacsatolás kiváltásához (Herbison, 2008). Főemlősökben viszont analóg, szexuálisan dimorf idegmag ezen az agyterületen nem ismert, és kisspeptin termelő neuront nagyobb számban csupán a nucleus infundibularisban (ARC) figyeltek meg (Romero *et al.*, 2007; Ramaswamy *et al.*, 2008). A ma is elfogadott nézet szerint (Knobil, 1980), a nucleus infundibularis mind a negatív, mind a pozitív ösztrogén visszacsatolási mechanizmusokért felelős lehet. További érdekes faji különbségre utalhat, hogy míg rágcslók kisspeptin idegsejtjei axo-szomatikus és axo-dendritikus kapcsolatok útján kommunikálnak GnRH idegsejtekkel (Kinoshita *et al.*, 2005; Clarkson &

Herbison, 2006), Ramaswamy és mtsai majomban elsősorban axo-axonális kapcsolatokat figyeltek meg az EM területén (Ramaswamy *et al.*, 2008).

Emberben nem ismert a hipotalamikuss kisseptin neuronrendszer felépítése. Nem áll rendelkezésre nemi dimorfizmusára és GnRH idegsejtekkel alkotott kapcsolatainak típusára vonatkozó irodalmi adat sem.

#### Neurokinin B (21)

A tachykinin peptidek szerepe meglehetősen sokrétű és a reprodukció vonatkozásában a kisseptinénél kevésbé specifikus. A csoportba tartozó neurokinin B és receptora, a neurokinin-3 receptor (NK3) csupán az elmúlt évben került az érdeklődés homlokterébe, mióta kiderült, hogy a neurokinin B-t vagy az NK3-t kódoló gének mutációi emberben hipogonadotrop hipogonadizmust okoznak (Guran *et al.*, 2009; Topaloglu *et al.*, 2009). Rágcsálókban a neurokinin B a hipotalamusz szintjén, GnRH idegsejtek közvetítésével hat, a kisseptinhez hasonló módon. Úgy tűnik azonban, támadáspontja nem a GnRH idegsejtek perikaryonjait és dendritjeit tartalmazó preoptikus area, hanem az EM. A GnRH idegsejtek EM-re vetülő axonjai NK3 immunreaktivitást mutatnak (Krajewski *et al.*, 2005) és axo-axonális kontaktusokat létesítenek neurokinin B-IR axonokkal (Ciofi *et al.*, 2006). A neurokinin B-IR axonok forrása az ARC egy olyan sejtcsoportja, mely birkában és egerben kisseptint, neurokinin B-t, NK3-t és dinorfint egyaránt termel (Goodman *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2009). Egy újonnan kibontakozó koncepció szerint, ezek a neuronok kiemelkedő jelentőséggel bírnak mind a pulzatilitás GnRH szekréció (Navarro *et al.*, 2009) mind a negatív ösztrogén visszacsatolás (Smith *et al.*, 2006) szabályozásában. Ezzel szemben, az RP3V kisseptin idegsejtjei nem tartalmaznak neurokinin B-t. Ugyanakkor fontos szerepet játszanak a pozitív ösztrogén visszacsatolásban (Herbison, 2008).

Emberi hipotalamuszban a neurokinin B-t termelő idegsejtek megoszlása, valamint a neurokinin B és kisseptin kolokalizációja nem ismert.

#### Endokannabinoidok (23)

Az endokannabinoid szignalizációs rendszer bioaktív lipid mediátorokat használ, melyek két legismertebb képviselője az anandamid (Devane *et al.*, 1992) és a 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG) (Mechoulam *et al.*, 1995). Az anandamid és a 2-AG kannabinoid receptorokhoz (CB1, CB2) kötve fejti ki hatását. A receptorok közül a központi idegrendszerben a CB1 izoforma dominál (Pagotto *et al.*, 2006). A preterminális axonokban működő CB1 a központi idegrendszer legbővebb G-protein kapcsolt receptora (Herkenham *et al.*, 1991; Katona *et al.*, 1999; Katona *et al.*, 2001). Aktiválása gátolja számos neurotranszmitter, köztük a GABA, a glutamát, a noradrenalin és az acetilkolin ürülését a CB1 receptort tartalmazó axonvégződésekből (Hoffman & Lupica, 2000; Gerdeman & Lovinger, 2001; Vizi *et al.*, 2001; Degroot *et al.*, 2006). Az endogén kannabinoidok mellett, ugyancsak kannabinoid receptorokon hat az indiai kender (*cannabis sativa*) fő hatóanyaga, a  $\Delta^9$ -tetrahidrokannabinol (THC).

A THC endokrin funkciók egész sorát, így a reprodukciót is befolyásolja, gátolva az LH szekrécióját (Smith *et al.*, 1978; Asch *et al.*, 1981). A gátlást GnRH neuronok közvetítik, mivelhogy *in vitro* a THC nem csökkenti az adenohipofízis LH elválasztását (Dalterio *et al.*, 1987; Wenger *et al.*, 1987), GnRH-val a szisztémásan adott kannabinoidok ovulációt gátló hatása kivédhető (Ayalon *et al.*, 1977; Smith *et al.*, 1978; Wenger *et al.*, 1987), és az agykamrába injektált THC - az LH szekréció fokozása mellett - megnöveli a mediobazális hipotalamusz GnRH tartalmát is (Wenger *et al.*, 1987).

A GnRH idegsejtek fő bemenetét GABAerg idegrostok jelentik. A más neuronrendszereken megfigyelhető gátló hatással ellentétben, a GABA a GnRH idegsejteket GABA<sub>A</sub> receptorokon át serkenti (DeFazio *et al.*, 2002). Ezért feltételezhető, hogy a reprodukció tengely THC okozta gátlásában kulcs szerepe lehet a serkentő GABAerg bemenetek CB1 receptor által közvetített kannabinoid érzékenységének. A CB1 receptorok hipotalamikuss megoszlására és GnRH idegsejtekkel alkotott kapcsolatára vonatkozóan morfológiai adatok jelenleg még nem állnak rendelkezésre. Nem

ismert továbbá, hogy a kannabinoid rendszer farmakológiai befolyásolása miképp hat a GnRH idegsejtek és GABAerg afferenseik elektromos aktivitására.

### **I/8. Glutamáterg hatások a reprodukzív tengely különböző szintjein**

A hipotalamusz fő serkentő neurotranszmittere az L-glutamát (van den Pol *et al.*, 1990). Ionotrop és metabotrop receptorain hatva, szerepet játszik valamennyi endokrin tengely, így a reprodukzív folyamatok szabályozásában is (Brann, 1995). Ismert, hogy a glutamát receptor agonista N-metil-DL-aszpartát *iv.* infúziójával patkányban pubertas praecox váltható ki (Urbanski & Ojeda, 1987). Ionotrop glutamát receptorok aktivációja egyaránt szerepet játszik a GnRH szekréció pulzatilis (Bourguignon *et al.*, 1989) valamint surge (Ping *et al.*, 1997) mintázatának kialakításában is. A glutamát hatásai a reprodukzív tengely különböző szabályozási szintjein érvényesülnek.

A centrális támadáspontok egyike a preoptikus area, ahol a GnRH surge idején a glutamát ürítése fokozódik (Ping *et al.*, 1994; Jarry *et al.*, 1995). A terület GnRH neuronjai glutamáterg szinaptikus beidegzést nyernek (Kiss *et al.*, 2003) és ionotrop glutamát receptorokat tartalmaznak (Eyigor & Jennes, 2000).

A GnRH idegsejtek neuroendokrin végződéseit tartalmazó mediobazális hipotalamusz a GnRH rendszert érő, centrális glutamát hatások egy további megjelenési helye. *In vitro* kísérletekben a területből készített explantátumok GnRH szekrécióját az N-metil-D-aszpartát fokozza (Bourguignon *et al.*, 1989; Arias *et al.*, 1993; Kawakami *et al.*, 1998a). A hatások valószínű keletkezési helye az EM külső zónája, ahol a perikapilláris térségben végződő GnRH axonok több ionotrop glutamát receptor alegységet is tartalmaznak (Kawakami *et al.*, 1998b). Az EM GnRH axonvégződéseire fiziológias viszonyok közt ható glutamát eredete azonban nem ismert. A három vezikuláris glutamát transzporter izoforma (VGLUT1-3) felfedezésével és immuncitokémiai markerként történő alkalmazásával, csupán az utóbbi években nyílt lehetőség a glutamátot átvivőanyagként használó, valódi excitatórikus idegsejtek megkülönböztetésére a glutamátot csupán metabolikus folyamatokban használó, egyéb sejtektől. A hipotalamusz serkentő neuronjai a glutamát szinaptikus vezikulába csomagolásáért felelős enzimek közül a VGLUT2 izoformát termelik (Herzog *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2003). Az EM külső zónájának gazdag VGLUT2-IR beidegzése (Lin *et al.*, 2003) felveti, hogy a GnRH terminálisokra ható glutamát egy eddig ismeretlen neuroszekretoros idegsejt populációból származhat. Másrészt, mivel a hipofízis szabályozásában ismert szerepű hipotalamikus régiók közül több is (OVLT, MPOA, PVN, nucleus periventricularis) expresszál VGLUT2 mRNS-t (Herzog *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2003), felmerül az a lehetőség is, hogy a glutamáterg aminosav fenotípus (VGLUT2 immunreaktivitás) az ismert, klasszikus neuroendokrin rendszerek, így a GnRH neuronok egy endogén sajátossága. Korábbi munkákból tudjuk, hogy a hipotalamusz neuroszekretoros rendszerei közül a growth hormone-releasing hormone (GHRH) termelő neuronok (Meister & Hokfelt, 1988), a tuberoinfundibuláris dopaminerg idegsejtek (Meister & Hokfelt, 1988), valamint a corticotropin-releasing hormone (CRH) termelő idegsejtek egy kis csoportja (Meister *et al.*, 1988)  $\gamma$ -amino vajsavat (GABA-t) tartalmaz. A további neuroendokrin rendszerek, köztük a GnRH idegsejtek aminosav neurotranszmitter fenotípusa azonban nem ismert. Glutamáterg jellegük felvetné, hogy a neuroendokrin terminálisokat szabályozó glutamát (Bourguignon *et al.*, 1989; Arias *et al.*, 1993; Kawakami *et al.*, 1998a) forrása endogén. A GnRH és a glutamát feltételezett ko-szekréciója új típusú autokrin/parakrin szabályozási mechanizmusok alapját jelentheti. A GnRH idegsejtek és további neuroendokrin sejtípusok glutamáterg aminosav fenotípusát több, értekezésben foglalt munkánkban is vizsgáljuk (7-10, 12, 14, 17).

Az adenohipofízis szintjén működő, további glutamáterg mechanizmusokra utal ionotrop és metabotrop glutamát receptorok előfordulása különböző hormontermelő sejtípusokon (Kiyama *et al.*, 1993; Bhat *et al.*, 1995). A receptorokon ható glutamát eredete azonban

kérdéses. Származhat egyrészt a portális keringésből, ahová az EM-t innerváló VGLUT2-IR terminálisokból ürülhet. Ennél valószínűbb a glutamát adenohipofízisben történő, helyi képződése és részvétele olyan lokális autokrin/parakrin glutamáterg szabályozási mechanizmusokban, melyekhez hasonlóan a hasnyálmirigy Langerhans szigeteiben már megfigyelték (Hayashi *et al.*, 2003). Az adenohipofízis feltételezett „glutamáterg” sejtípusait a VGLUT1 és VGLUT2 marker enzimek immunhisztokémiai vizsgálatával kíséreltük meg azonosítani (11, 14, 17, 20).

A VGLUT1 és VGLUT2 enzim izoformák termelése a központi idegrendszerben regulált. Ahol az enzimek a szinaptikus jelátvitelben játszanak szerepet, változó bioszintézisük a kvantális méret és az excitatórikus poszt-szinaptikus áramok szabályozásának fontos eszköze (Wojcik *et al.*, 2004; Erickson *et al.*, 2006). Az EM-ben a VGLUT2-IR terminálisokból ürülő glutamát feltételezett autokrin/parakrin szerepe új szabályozási mechanizmust jelent a GnRH és további neuroszekretoros rendszerek nem-szinaptikus, lokális szabályozásában. Az a kérdés, hogy neuroszekréció/szekréció helyén működő VGLUT2 enzim expressziója endokrin állapotok függvényében szabályozott-e, a VGLUT2-t termelő sejtek elhelyezkedésének ismeretében, kvantitatív *in situ* hibridizációval vizsgálhatóvá válik. Az értekezésben foglalt munkáink három különböző endokrin modellben vetik fel a VGLUT2 expresszió szabályozottságát (10, 11).

### **I/9. Agyi ösztrogén szignalizáció élettana és változásai menopauzában**

Fentiekben az ösztrogén visszacsatolásnak a reprodukció szabályozásában játszott szerepével foglalkoztunk. A gonadális ösztrogének azonban jóval általánosabb élettani hatást is gyakorolnak a központi idegrendszer, így az agykéreg működésére, melyek egy része genomiális, más része gyors, nem-genomiális mechanizmusú (Genazzani *et al.*, 2005).

Emberben az életkor előrehaladtával csökken a petefészek tüszőinek száma. A menopauza beálltával - működőképes tüszők híján - az E2 termelése megszűnik. Az E2 célszerveiben, így a központi idegrendszerben számos működési zavar jelentkezik (Morrison *et al.*, 2006). A hőhullámok, verejtékezés, elhízás, magas vérnyomás, szorongás, depresszió, fejfájás és álmatlanság olyan gyakori panaszok, melyek összefüggésbe hozhatók a hipotalamusz, hippocampus és limbikus struktúrák megváltozott működésével (Keenan *et al.*, 2001; Adams & Morrison, 2003; Genazzani *et al.*, 2005). A prefrontális agykéreg kitüntetett szerepet játszik több olyan kognitív, érzelmi, figyelmi, motivációs és tanulási folyamatban, melyek a menopauzát követő ösztrogén hiányos állapotban károsodhatnak (Keenan *et al.*, 2001; Adams & Morrison, 2003; Genazzani *et al.*, 2005). A kellő időben elkezdett hormonpótlás a funkciók romlását mérsékelni vagy megelőzni képes (Bohacek & Daniel, 2010; Sherwin, 2003). Menopauzában mélyreható változások érintik a noradrenerg-, dopaminerg-, szerotoniner-, kolinerg- és peptiderg neurotranszmissziót (Genazzani *et al.*, 2005). Nem ismert azonban, hogy az alacsony E2 szint milyen transzkripciós változásokat idéz elő, és melyek játszhatnak szerepet a fenti funkciók hanyatlásában.

Az értekezésben szereplő egyik tanulmányunk az aggyal mint a gonadális tengely célszervével foglalkozik. Az E2 frontális agykéregre gyakorolt genomiális hatásait vizsgáljuk a teljes transzkriptom szintjén, ovariectomizált nőstény patkányokon, microarray megközelítéssel (19).

Öregedő rágcsálókban a reprodukzív funkciók fokozatos megszűnését nem a tüszők eltűnése, hanem a tengely megváltozott működése okozza, mely igen hosszan tartó folyamat. Ezt a 8-18. hónap közötti életkort sokkal inkább az E2 szintek változatossága, mintsem alacsony szintje jellemzi. Az emberi menopauza hormonális viszonyait is hűen tükröző rágcsáló modellek előállítása ezért nehézségbe ütközik (Acosta *et al.*, 2010). Egyik tanulmányunk a humán menopauza modelljeként középkorú ovariectomizált patkányokat

alkalmaz. A krónikus hormonpótlás frontális agykérgi génexpresszióra gyakorolt hatásait egy négyhetes E2 infúziót követően, microarray megközelítéssel vizsgáljuk (22).

## II. CÉLKITŰZÉSEK

Az értekezésben tárgyalt munkák a reprodukív tengely működésének központi idegrendszeri mechanizmusait vizsgálták. A GnRH neuronrendszerre vonatkozó egyes megfigyelések szélesebb összefüggéseit további neuroszekretoros rendszereken is tanulmányoztuk. Az alábbi konkrét kérdéskörök megértését céloztuk meg:

### II/1. GnRH neuronok afferens szabályozását végző neurotranszmitter rendszerek azonosítása

- Hisztaminerg afferenciák szerepének vizsgálata a pozitív ösztrogén visszacsatolásban (1)
- Az NPY tartalmú afferensek eredetének feltárása (5)
- Kolinerg afferensek azonosítása (16)
- A humán hipotalamikus kisspeptin rendszer anatómiai viszonyainak tisztázása (21)
- Neurokinin B és kisspeptin idegsejtek kapcsolatának vizsgálata emberben (21)
- Endokannabinoid szignalizáció tanulmányozása GnRH idegsejtek GABAerg afferens kapcsolataiban (13, 23)

### II/2. Direkt ösztrogén visszacsatolás igazolása GnRH neuronokban: A “ $\beta$ ” típusú ösztrogén receptor szerepe

- *In situ* hibridizációs eljárás kidolgozása alacsony kópiaszámú mRNS-ek hisztokémiai kimutatására (4)
- ER- $\beta$  mRNS expresszió igazolása patkány GnRH neuronjaiban (2)
- Ösztrogén receptor ligandum kötésének megjelenítése patkány GnRH neuronjaiban (2)
- Nukleáris ER- $\beta$  fehérje detektálása immuncitokémiával patkány GnRH neuronjaiban (3)
- Az ER- $\beta$  immuncitokémiai kimutatása emberi hipotalamusz minták GnRH idegsejtjeiben (15)
- E2-regulált gének és szignalizációs útvonalak azonosítása a GnRH-t termelő GT1-7 sejtvonalban microarray módszerrel (18)
- ER- $\beta$  megoszlásának leírása OT-t és VP-t termelő hipotalamikus neuronok csoportjaiban patkányban és emberben (6)

### II/3. Glutamáterg (VGLUT2) fenotípus megjelenítése GnRH neuronokban és további neuroszekretoros rendszerekben

- Glutamáterg (VGLUT2 fenotípusú) neuroszekretoros idegsejtek lokalizálása (12)
- VGLUT2 termelés *in situ* hibridizációs és immuncitokémiai kimutatása GnRH neuronokban (7)
- Egyéb neuroszekretoros rendszerek aminosav fenotípusának azonosítása (8-10)
- Glutamáterg markerek vizsgálata az adenohipofízis egyes hormon termelő sejtjeiben (11, 20)
- Szabályozott VGLUT2 expresszió bemutatása endokrin állatmodelleken (10, 116)

### II/4. 17 $\beta$ -ösztradiol E2 kötését követő transzkripciós válaszok azonosítása a frontális agykéregben

- A frontális agykéreg E2-regulált génjeinek és szignalizációs útvonalainak azonosítása ovariectomizált patkánymodellben (19)

- Krónikus ösztrogén pótlás génexpresszióra gyakorolt hatásainak kimutatása ösztrogénhiányos középkorú nőstény patkány frontális agykérgében (22)

### III. MÓDSZEREK

Az alábbiakban rövid áttekintést adunk a felhasznált módszerekről, a rövid (tézises) értekezés formai sajátosságainak megfelelően. A módszerek részletes leírása az eredeti közleményekben található meg (értekezés VI/2. fejezete), melyekre a zárójelbe tett sorszámokkal utalunk.

#### III/1. KÍSÉRLETI ÁLLATOK

Állatkísérleteinket az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Állatkísérleti Etikai Bizottsága és a Budapest Fővárosi Állat- és Élelmiszerlánc- és Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás engedélyével végeztük (A5769-01), összhangban az „Állatok védelméről és kíméletéről” szóló, 1998. évi XXVIII. tv. 32. § (3) rendelkezéseivel. Az állatokat standard állatházi körülmények között tartottuk (világítás 06:00-18:00 h között, hőmérséklet  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , rágcsálótáp és víz folyamatosan rendelkezésre állt). Az eredmények reprodukálhatósága érdekében, a morfológiai tanulmányokat állandó hormonszintek mellett, intakt hím vagy ovariectomizált nőstény rágcsáló modellekben végeztük el. Főképp 200-500g súlyú, felnőtt Wistar és Sprague-Dawley patkányok (1-4, 6-12, 14, 17, 19, 20), az időskori E2-hiányos agyi állapot modellezésére (22), tenyésztből kivont 1-1,5 éves Harlan-Wistar anyaállatok kerültek felhasználásra. Egyes vizsgálatokban CD1 és C57/Bl6 törzsekből származó, vad-típusú egerek (13), CB1-génkiütött (13, 23) és VGLUT1-génkiütött (20) egerek, valamint a GnRH promotor irányítása alatt zöld fluoreszcens proteint expresszáló, GnRH-GFP transzgenikus egerek (5, 23) szerepeltek.

#### III/2. MŰTÉTEK, KEZELÉSEK

##### Ovariectomia, ösztrogén kezelések (1, 2, 3, 6, 11, 19, 22)

Ösztrogén-hiányos állapot előidézésére felnőtt nőstény patkányok és egerek kétoldali ovariectomiáját végeztük el, általános érzéstelenítésben (25 mg/kg ketamine, 5 mg/kg xylaxet és 2,5 mg/kg pipolphen, *ip.*). Exogén hormonpótlásra 7-14 nappal a műtétet követően került sor, a következő kezelési eljárások egyikével: E2 egyszeri olajos injekciója *sc.* (1, 11, 19), E2 olajos oldatát tartalmazó szilikon kapszula *sc.* beültetése 1-7 napra (2, 3), vagy propilén glikolban feloldott E2 folyamatos *sc.* infúziója Alzet ozmotikus minipumpával 4 héten keresztül (22). Az E2 hiányos kontroll csoport kezelése valamennyi esetben vivőanyaggal történt.

##### Neonatalis nátrium glutamát kezelés (5)

A mediobazális hipotalamusz NPY/AGRP fenotípusú neuronjainak elpusztítására használt kezelés során, az 1. és 3. posztnatalis napokon nátrium glutamát 8%-os vizes oldatát 4 mg/g dózisban, majd az 5., 7. és 9. napon 8 mg/g dózisban injektáltuk újszülött egerek bőre alá. Felnőtt állatokból nyert, kretilibolyával megfestett, hipotalamikus metszeteken az ARC neuronális elemeinek hiánya jelezte a kezelés eredményességét. Immuncitokémiai vizsgálatokban jellemző volt az AGRP immunreaktivitást mutató idegrostok számának nagyfokú csökkenése is, melyek kizárólagos forrása az ARC (Broberger *et al.*, 1998).

##### Hypo- és hyperthyreoid patkánymodellek előállítása (11)

Felnőtt, hím, Wistar patkányokat hypothyreoiddá 0,02%-os methimazole oldat 3 hétig tartó itatásával tettünk. Hyperthyreoid állapotot 10µg/diem tyroxin 10 napon keresztül végzett, *ip.* injekciójával hoztunk létre.

##### „Sóterhelés” magnocelluláris vazopresszin neuronok krónikus stimulációjára (10)

A sóterhelt állatok ivóvíz helyett 7 napig 2%-os konyhasóoldatot kaptak.

##### Kolhicin kezelés perikaryonok immuncitokémiai láthatóvá tételére (1)

A hisztaminerg perikaryonok immuncitokémiai megjelölése kolhicin előkezelést (50-150 mg/100g, *icv.*) igényelt. A kolhicint sztereotaxiás készülék és Hamilton fecskendő segítségével juttattuk a patkányok oldalsó agykamrájába a szövetgyűjtést 24-48 órával megelőzően.

#### *In vivo* <sup>125</sup>I [ösztrogén] kötési vizsgálat (2)

Ösztrogén *in vivo* kötésének bemutatásához 200 µl vivőanyagban (50% DMSO/50% foszfát puffer) 2 µg/kg 17α iodovinyl-11β-methoxyestradiolt (<sup>125</sup>I-ösztrogén) injektáltunk ovariectomizált patkányok bőre alá. Az állatok agyát 4-6 órával később, transzkardiális perfúzióval (4%-os paraformaldehid oldat) rögzítettük.

### III/3. SZÖVETTANI METSZETEK

Hisztológiai vizsgálatokban (immuncitokémia és *in situ* hibridizáció) többféle szövettani rögzítési és metszetkészítési eljárást alkalmaztunk.

*In situ* hibridizációs mRNS kimutatást általában tárgylemezre szárított, 12 µm vastag, frontális síkú metszeteken végeztünk. A metszeteket kriosztát berendezéssel készítettük előzőleg porított szárazjégen lefagyasztott agyszöveti blokkokból, és zselatinnal vagy 3-amino-propil-trietoxi-szilánnal előkezelt lemezekre rögzítettük. A rövid szöveti fixálást (5-30 perc) a prehibridizációs munkafolyamat első lépéseként, 4%-os paraformaldehid oldattal végeztük el (2-4, 6-10).

Fénymikroszkópos immuncitokémia (5, 7-13, 16, 19, 20, 23) végzésére, továbbá *in situ* hibridizációs és immuncitokémiai eljárások együttes alkalmazására (12) 4%-os paraformaldehid oldattal transzkardiálisan perfundált állatok szöveteit használtuk, melyekből fagyasztó mikrotómmal készítettünk 20-30 µm vastagságú, frontális síkú, „úsztatva kezelt” metszeteket. Egyes antigének immuncitokémiai kimutatására 4% akroleint és 2% paraformaldehidet tartalmazó rögzítőkeveréket alkalmaztunk (3, 6). Az immuncitokémiát megelőzően, az akrolein feleslegét a metszetek nátrium borohidrid (0,5-1%; 30 perc) előkezelésével semlegesítettük. A hisztaminerg idegelemek immuncitokémiai megjelenítése 4%-os 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide oldattal elvégzett, egyedi szövetrögzítési eljárást igényelt (1).

Humán szövettani vizsgálatokhoz (1, 6, 15, 21) boncolásból származó hipotalamikus mintákat használtunk, melyeket a Budapesti Regionális Tudományos Etikai Tanács engedélye (TUKEB 49/1999) alapján, a Semmelweis Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetével kollaborációban gyűjtöttünk. A hipotalamikus blokkokat immerziós módszerrel fixáltuk 4%-os paraformaldehid oldatban vagy 4% akroleint és 2% paraformaldehidet tartalmazó rögzítőszer keverékben (1-3 hét), majd 20-30%-os szaharóz oldattal infiltráltuk (24-168 h). Végül fagyasztó mikrotómmal 20-30 µm vastag, úsztatva kezelt szövettani metszeteket készítettünk. Az akrolein feleslegét 1%-os nátrium borohidrid oldattal semlegesítettük (30 perc).

Elektronmikroszkópos vizsgálatok céljára glutáraldehid- vagy akrolein tartalmú rögzítőszerrel perfundált rágszáló szöveteket használtunk, melyekből vibratom metszőberendezéssel, fagyasztás nélkül készítettünk 30-40 µm vastagságú, frontális síkú metszeteket (5, 6, 12, 13, 16, 23). Az immuncitokémiai lépéseket megelőzően a fixálószer maradványát 1%-os nátrium borohidrid oldattal semlegesítettük (30 perc).

### III/4. FÉNY- ÉS ELEKTRONMIKROSKÓPOS IMMUNCITOKÉMIA

Immuncitokémiai módszerek alkalmazása előtt a metszeteket 20 percig 0,2%-os Triton X-100 oldattal előkezeltük a reagens penetrációjának elősegítésére. Elektronmikroszkópia végzésekor a szövetek átjárhatóságát folyékony nitrogénnel végzett, fagyasztásos feltárással biztosítottuk (5, 6, 12, 13, 16, 23). A szöveti peroxidáz aktivitást 0,5%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldat használatával (30 perc) csökkentettük.

A fénymikroszkópos vizsgálatok többségében immunperoxidáz kimutatási módszert alkalmaztunk, primér antitest (48 h, 4°C), biotinnel jelölt másodlagos antitest (1 h, szobahőn), majd avidin peroxidáz-komplex (ABC Elite kit, Vector; 1 h, szobahőn) egymás utáni alkalmazását követően. A peroxidáz reakció megjelenítését diaminobenzidin (DAB) vagy nikkel-diaminobenzidin (Ni-DAB) kromogént tartalmazó hívóoldattal végeztük.

Kettős-immunperoxidáz alapú vizsgálatokban, melyek célja egy nukleáris és egy citoplazmatikus antigén egy neuronon belüli kolokalizációja (1, 3, 6, 15) vagy két különböző neuron fenotípus közti afferens kapcsolat fénymikroszkópos kimutatása (1, 5, 16, 21, 23) volt, a fekete színű, ezüst-amplifikált (Liposits *et al.*, 1984) Ni-DAB kromogént a barna színű DAB kromogénnel kombinálva alkalmaztuk.

Immunfluoreszcens módszert kettős- és hármas-jelöléshez használtunk. Különböző fajokban termelt, specifikus elsődleges antitestek alkalmazása után, az antigéneket fluorokrómhoz konjugált másodlagos antitestekkel mutattuk ki. Egyes antigének esetében biotinhez kötött másodlagos antitestet, majd fluoreszcein izotiocianáttal vagy indokarbocianinnal konjugált avidint alkalmaztunk. Több esetben használtuk a biotin-tyramid jelerősítési rendszert is. A humán hipotalamikus mintákon végzett immunfluoreszcens vizsgálatokat megelőzően a metszeteket acetonnal delipidáltuk és szudán fekete lipidfestővel kezeltük (19, 21, 22), a lipofuszin depozitumokból eredő autofluoreszcencia csökkentésére. A fluorokrómokkal megjelölt preparátumokat végül Zeiss epifluoreszcens mikroszkóppal (5) és Bio-Rad Radiance 2000 konfokális mikroszkóppal (7-12, 20, 21, 23) vizsgáltuk.

Ultrastrukturális vizsgálatokra preembedding immuncitokémiát alkalmaztunk (5, 6, 12, 13, 16, 23). Az antigének kimutatásához immunarannyal jelölt másodlagos antitesteket, peroxidáz enzimreakciót, vagy e kettő kombinációját használtuk. Az egyes- és kettős-immunjelölésen átesett metszeteket Durcupan epoxy műgyantába ágyztuk. Az ultramikrotómmal készített, ultravékony metszeteket Formvar hártával borított rézgridekre vettük fel, ólom citráttal kontrasztoltuk, végül Hitachi 7100 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

### III/5. IN SITU HIBRIDIZÁCIÓ

#### *Komplementer ribonukleinsav (cRNS) próbák gyártása*

Az „antiszensz” (komplementer ribonukleinsav; cRNS) próbák *in vitro* előállításához komplementer dezoxiribonukleinsav (cDNS) templatokat használtunk. Ezek többségét - kereskedelmi forgalomban kapható - klónozó kitek („PGEM T”, Promega; „TOPO TA”, Invitrogen) alkalmazásával magunk készítettük (2-4, 6, 7, 9, 19). Elsőként a kimutatni kívánt mRNS-t bőven tartalmazó agyterületekből teljes RNS-t izoláltunk. Ebből oligo-dezoxitimidin „primer” és reverz transzkripció használatával cDNS könyvtárat készítettünk. Ezután már a vizsgálandó mRNS-re specifikus primer párokat alkalmazva, polimeráz láncreakcióban (PCR) a cDNS könyvtárból egy 250-1500 bázispár hosszúságú szakaszt sokszorosítottunk, melyet klónozó vektorba ligáltunk. A transzformációval *E. coli* baktériumba (DH5α törzs) bejuttatott plazmidot LB táptalajban 100µg/ml ampicillin jelenlétében szaporítottuk, majd a Qiagen Maxi Prep kittel izoláltuk. Az inszertumok bázis sorrendjét valamennyi esetben szekvenálattással ellenőriztük. A detektálandó mRNS-re nézve komplementer bázissorrendű, antiszensz RNS szekvenciák *in vitro* átírását megelőzően, a cirkuláris plazmid vektort restriktációs endonukleázzal felnyitottuk, majd fenol-kloroform-izoamil alkohol extrakció és NaCl/ethanol kicsapás segítségével tisztítottuk. Az RNS átírását - az inszertum irányultságától függően - T7 vagy SP6 RNS polimerázzal végeztük el. Izotópos hibridizáció céljára a reakciót <sup>35</sup>S-UTP (2-4, 6-12, 19), nem-izotópos módszer használatához digoxigenin-11-UTP (2, 3, 6-10) vagy fluoreszcein-12-UTP (6, 10) jelenlétében hajtottuk végre.



*Hibridizációs oldat készítése*

A hibridizációs oldatot közvetlenül használat előtt kevertük össze „hibridizációs puffer”-ből (50% formamid, 2X citrát / „SSC”/ puffer, 20% dextrán szulfát, 1X „Denhardt oldat”, 500 µg/ml élesztő transzfer ribonukleinsav, 500 µg/ml Na-heparin), 50-1000 mM ditiotreitoltól, valamint a cRNS hibridizációs próbá(k)ból. Alacsony kópiaszámú mRNS-ek kimutatásakor (2-4, 6-12) az anatómiai munkák sikere a hibridizációs oldat ditiotreitoltól, próba és dextrán szulfát tartalmának növelésén alapult, mely módszertani eredményként az értekezés IV/2. fejezetének részét képezi (4).

*In situ hibridizáció tárgylemezre felhúzott metszeteken*

A tárgylemezre rögzített metszeteket tárgylemeztartó dobozokban -80 °C-on tároltuk felhasználásig. Felmelegítést követően, az irodalomban elterjedt prehibridizációs lépéseket alkalmaztuk, ribonukleáz-mentes oldatokat és laboratóriumi eszközöket használva: 5-30 perc szöveti rögzítés 4%-os paraformaldehid oldattal, acetilálás 0,25%-os ecetsav anhidriddel (10 perc), dehidráció alkoholsorban (2-2 perc), delipidálás kloroformmal (5 perc) és részleges rehidráció 100%-os, majd 96%-os etanollal (2-2 perc). Ezt követően, a metszetekre hibridizációs oldatot pipettáztunk és csipesszel üveg fedőlemezt helyeztünk. A hibridizációt 52 °C-on, 12-40 óráig, nedves kamrában hajtottuk végre. Az aspecifikus próbakötést poszthibridizációs kezelésekkel csökkentettük (20µg/ml ribonukleáz A oldat, 30 perc, 37 °C; 0,1X citrát / „SSC”/ puffer, 62°C, 60 perc). Izotóppal jelölt próbák használatát követően, a tárgylemezeket 70%-os etanol oldatban részlegesen dehidráltuk, majd megszáritottuk. Nem-izotópos próbákat használva, szárítás előtt végeztük el a digoxigenin (vagy fluoreszcein) immuncitokémiai kimutatását. Kettős- vagy hármas-*in situ* hibridizáció végzésekor ezt követte az izotóppal jelölt próba autoradiográfiás megjelenítése (2, 3, 6-10).

*In situ hibridizáció úsztatva kezelt metszeteken*

A módosított prehibridizációs kezelések a metszetek acetilálásából (0,25%-os ecetsav anhidrid; 10 perc) és részleges delipidálásából (50%-os, 70%-os és 50%-os aceton használata; 5-5 perc) álltak. A hibridizációt PCR csövekben végeztük el. Ezt a felhúzott metszetek kezelésénél már részletezett poszthibridizációs lépések követték, majd a nem-izotópos próbába épített markerek (digoxigenin, fluoreszcein) vagy endogén szöveti antigének immuncitokémiai kimutatását hajtottuk végre. A metszeteket végül tárgylemezre rögzítettük, megszáritottuk, majd a radioizotóppal jelölt próbák autoradiográfiás detektálását végeztük el. Egyes antigének kimutathatósága a hibridizációs kezelések során sérült. Ilyen esetben először az immuncitokémiai jelet detektáltuk oly módon, hogy a szöveti mRNS-ek lebomlását az antitest oldatokhoz és egyéb reagensekhez hozzáadott Na-heparinnal (1000U/ml) gátoltuk (12).

*Nem-izotópos hibridizációs jelek kimutatása*

A nem-izotópos hibridizáció jel kimutatására többféle megközelítést alkalmaztunk. A cRNS próbába beépített digoxigeninhez először többnyire tormagyökér peroxidázzal konjugált anti-digoxigenin antitestet kötöttünk, majd a peroxidáz reakció erősítésére biotin-tyramid szignál amplifikációt alkalmaztunk. A lerakódott biotin detektálására ezt követően peroxidáz alapú vagy fluoreszcens módszert választottunk (2, 3, 6-10). Hasonló érzékenységgű megközelítésnek bizonyult az alkalikus foszfatázzal konjugált anti-digoxigenin antitest használata, a jel végső kimutatását az 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium kromogén rendszerrel végezve el (6, 10).

*Autoradiográfia*

A <sup>35</sup>S-UTP-vel megjelölt próbákból származó autoradiográfiás jelet regionális analízis céljára röntgen filmen, egy-sejt elemzés céljára Kodak fotoemulzióon rögzítettük, 1-6 hetes expozíciós időt használva (4°C). Alacsony jel expresszió esetén, egyedi neuronok láthatóvá tételéhez további módszer optimalizálást is végeztünk (4).

### Kvantitatív képelemzés

A röntgen filmen megjelenített, különböző kezelési csoportokból származó hibridizációs képek összehasonlító elemzésére (11) a digitalizált autoradiogramok denzitometriás elemzését végeztük el, az analizált területek átlag szürkesség értékének („mean grey value”) meghatározásával (Image J programcsomag; <http://rsb.info.nih.gov/ij/download/src/>). Egyedi idegsejtek autoradiográfiás képeit digitális felvételeken elemeztük, a jel intenzitását az ezüstszemcsék által borított pixelek számával jellemezve (10). Csoportok összehasonlítására egy- vagy többutas varianciaanalízist alkalmaztunk.

### III/6. MICROARRAY VIZSGÁLATOK

A microarray vizsgálatok egy részében a GnRH-t termelő és szekretáló, GT1-7 neuronális sejtvonal (Mellon *et al.*, 1990) transzkriptomjának E2-függő regulációját tanulmányoztuk (18). Az E2-t  $10^{-8}$  M koncentrációban, 0,5h, 2h, 8h, 24h és 48h kezelési idővel alkalmaztuk az ösztrogén-mentes tápoldatban. A tenyészetekből izolált RNS minták (RNeasy Lipid Tissue Mini Kit, Qiagen) feldolgozását az Affymetrix cég technikai útmutatásai alapján végeztük el. A megjelölt cRNS-eket az “Affymetrix murine MG-U74Av2” chipen hibridizáltuk. A Hewlett-Packard G2500A Gene Array Scanner-rel rögzített képek elemzését az ArrayAssist programcsomaggal (Stratagene, ArrayAssist® Expression Software) végeztük el.

Az E2 frontális agykérgi transzkriptomjára gyakorolt hatásait is microarray metodikával vizsgáltuk (19, 22). E2-kezelt és ovariectomizált kontroll állatok agyait 10%-os RNAlater oldat transzkardiális perfúziójával rögzítettük. Az azonos módon kimetszett, prefrontális, motoros és szenzoros kérgi területeket magukban foglaló, frontális lebeny blokkokból teljes RNS-t izoláltunk (RNeasy Lipid Tissue Mini Kit, Qiagen), melynek minőségét Bioanalyzer berendezéssel (Agilent, Santa Clara, CA) ellenőriztük. A minták további feldolgozását Affymetrix protokollok alapján, a teljes transzkriptom analízisét biztosító Affymetrix Rat 230 2.0 Array használatával végeztük el. A phycoerythrinrel megfestett array-ek fluoreszcens képét GCS 3000 confocal laser scanner-rel (Affymetrix) digitalizáltuk. Ezt követően, a fluoreszcens intenzitásokat a GCOS program (Affymetrix) alkalmazásával határoztuk meg.

### III/7. RT-qPCR ÉS TAQMAN ARRAY MÓDSZEREK

A microarray vizsgálatok eredményeit válogatott esetekben valós-idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR) módszerrel is megerősítettük. Az egyedi RNS mintákból először cDNS-eket készítettünk, melyeket egyedi PCR reakciókban (18) vagy az Applied Biosystems (Santa Clara, CA) „TLDA microfluidic card” megközelítésével vizsgáltuk. Az utóbbi módszer 96 cDNS mintapár párhuzamos kvantitatív elemzését biztosította (19, 22). A metodika további technikai részletei az eredeti közleményekben megtalálhatók (18, 19, 22).

### III/8. IN VITRO SZELET ELEKTROFIZIOLÓGIA

Elektrofiziológiai vizsgálatok céljára GnRH-GFP transzgenikus egerek mediális szeptumából és preoptikus területéről 250µm vastagságú, akut szeleteket készítettünk vibratome metszőberendezéssel. Az elektrofiziológiai kísérletek részletes technikai leírása az eredeti közleményben olvasható (23).

A CB1 agonista WIN55,212 (1 µM) GnRH idegsejtek tüzelésére gyakorolt hatását loose-patch-clamp vizsgálatokkal tanulmányoztuk. A neuron aktivitásra gyakorolt hatás kivédését ionotrop glutamát receptor antagonistá (2 mM kinurénsav) vagy GABA<sub>A</sub> receptor antagonistá (20 µM bikukullin-methiodide) szerekkel kíséreltük meg.

Whole-cell patch-clamp kísérletekben CB1 receptoron ható szerek GABA<sub>A</sub> receptor mediálta hatásait vizsgáltuk. Az akciós potenciál-függő áramokat 750nM tetrodotoxinnal gátoltuk. A különböző vizsgálatokban CB1/CB2 agonista WIN55,212 (1µM) és CB1 antagonistá AM251 (1µM) GABAerg miniatűr posztzinaptikus áramokra gyakorolt hatásait

elemeztük. A GnRH neuronok 2-AG termelésének gátlására használt tetrahydrolipstatin (10  $\mu$ M) az intracelluláris oldatban került alkalmazásra.

#### IV. EREDMÉNYEK

Az eredmények részletesebb leírása és megbeszélése a VI/2. fejezetben felsorolt, eredeti közleményekben található, melyekre a zárójelbe tett sorszámokkal utalunk.

##### IV/1. GnRH neuronok afferens szabályozását végző neurotranszmitterek rendszerek azonosítása

###### Hisztaminerg afferentáció szerepének vizsgálata a pozitív ösztrogén visszacsatolásban (1)

A hisztaminerg idegelemek immuncitokémiai megjelenítése igényelte, hogy az antigénygyártáskor a hisztamin konjugációjára használt speciális rögzítőszer jelen legyen a szöveti fixálóban is (Panula *et al.*, 1984). Kolhicinnel kezelt, ovariectomizált nőstény patkányokon elvégzett kettős-immuncitokémiai vizsgálataink kimutatták, hogy a tuberomammilláris mag valamennyi alegységében (E1-E5) a hisztamin-IR idegsejtek többségének (66-81%) magja tartalmazza az ER- $\alpha$ -t (1/1. ábra).

Patkányból származó és humán hipotalamikus szöveteken egyaránt megvizsgáltuk, hogy a hisztaminerg neuronrendszer beidegzi-e a GnRH neuronokat. A hisztaminerg axonok mindkét fajban számos axo-szomatikus és axo-dendritikus kapcsolatot létesítettek GnRH idegsejtekkel. Patkányban a GnRH-IR idegsejtek  $40 \pm 2.3\%$ -án, humánban  $51 \pm 3.0\%$ -án figyeltük meg hisztamin-IR axonok kontaktusait (1/3. ábra).

Dr. Clive Coen londoni munkacsoportjával kollaborációban megvizsgáltuk, hogy az általunk feltárt, ösztrogén-érzékeny hisztaminerg pálya részt vesz-e a pozitív ösztrogén visszacsatolásban, és ha igen, melyik hisztamin receptoron keresztül. A kísérletek során ovariectomizált patkányok ösztradiol benzoát kezelésével (50  $\mu$ g/0,2 ml olajos *sc.* injekció) LH surge-öt váltottunk ki az injekció másnapján, melynek bekövetkeztét a szérum LH szintek radioimmunoassay vizsgálatával igazoltuk, fél óránként gyűjtött mintákból. Az oldalsó agykamrába infúzióval bejuttatott H2 receptor antagonistá, ranitidin (0,5 ml/min) nem befolyásolta az LH surge normál lefolyását. Ezzel szemben, a H1 receptor antagonistá mepyrámin infúziója meggátolta az ösztrogénnel kiváltható LH surge jelentkezését (1/4. ábra).

###### Az NPY tartalmú afferensek eredetének feltárása (5)

A hím GnRH-GFP transzgenikus egereken elvégzett vizsgálataink megmutatták, hogy az ARC neuronjainak pusztulását okozó, újszülöttkori nátrium glutamát kezelés következtében felnőttkorban a preoptikus area-t beidegző NPY idegrostok száma jól látható mértékben lecsökken (5/1C-D ábrák). A csökkenést az ARC NPY-t és AGRP-t egyaránt termelő neuronjainak pusztulása okozta, mint azt a hipotalamikus AGRP immunreaktivitás csaknem teljes eltűnése jelezte (5/1E-F ábrák). A kezelés hatására a GnRH neuronok perikaryonján és proximális dendritjén észlelt NPY-IR kontaktusok száma  $63.7 \pm 5.0\%$ -os csökkenést mutatott, igazolva, hogy az ARC a GnRH idegsejtek NPY bemenetének legjelentősebb forrása. A kvantitatív elemzés finomítására hármass-fluoreszcens vizsgálatokat végeztünk. A GnRH-GFP neuronok kimutatására a GFP fluoreszcenciáját használtuk, kombinálva azt kettős immunfluoreszcens módszerrel. Megállapítottuk, hogy a GnRH idegsejtekkel kapcsolatban álló NPY-IR axon varikozitások fele ( $49.1 \pm 7.3\%$ ) tartalmaz ARC-beli eredetre utaló AGRP immunreaktivitást is (5/4D-F ábrák). A rostok további egynegyede ( $25.4 \pm 3.3\%$ ) az agytörzsi katekolaminerg rendszer marker enzimjét, a DBH-t tartalmazta (5/4J-L ábrák), míg a rostok maradék egynegyede egyik topográfiai marker antigént sem hordozta. Az AGRP/NPY rendszer GnRH neuronokkal alkotott kapcsolatát ultrastrukturális szinten is

tanulmányoztuk, immunarany és DAB jelölőanyagok kombinációjával. Az AGRP-IR axonok valódi axo-szomatikus és axo-dendritikus szinapszist képeztek GnRH neuronokkal. A szinaptikus specializációk karaktere minden esetben – GABAerg kapcsolatokra jellemzően – szimmetrikus volt (**5/3B ábra**).

#### Kolinerg afferensek azonosítása (16)

A GnRH neuronrendszer kolinerg beidegzését hím patkányokon, fény- és elektronmikroszkópos immuncitokémiai vizsgálatokkal vetettük fel. A kolinerg idegelemek megjelenítését két marker enzim, a vezikuláris acetilkolin transzporter és a kolin-acetiltranszferáz immuncitokémiai kimutatásával végeztük el.

A GnRH idegsejtek fő megoszlási területein (OVLT és MPOA) nagy számban figyeltünk meg kolin-acetiltranszferáz- és vezikuláris acetilkolin transzporter-IR idegrostokat. Jelölt kolinerg sejtestek laterálisabb elhelyezkedésben, a Broca-féle diagonális köteg horizontális magjában tűntek elő (**16/1A és B ábrák**). A GnRH idegsejtek megoszlási területén vastag és vékony kolinerg idegrostok egyaránt előfordultak. Az utóbbiak gyakorta axo-szomatikus és axo-dendritikus kontaktust képeztek GnRH idegsejtekkel (**16/1C-E**). Elektronmikroszkóppal vizsgálva a kolinerg rostokat (**16/2. ábra**), azok számos, asztroglia közbeékelődéstől mentes appozíciót képeztek GnRH neuronokkal. Valódi szinapszis viszonylag ritkán volt megfigyelhető a preoptikus területen és specifikusan, GnRH idegsejteken. Ezen ritka szinapszisok aszimmetrikus specializációt mutattak (**16/2E és F ábrák**).

#### A humán hipotalamikus kisspeptin rendszer anatómiai viszonyainak tisztázása (21)

Magánforrásból származó anti-mouse kisspeptin-10 és anti-humán kisspeptin-54 antitestek használata immuncitokémiára hasonló kisspeptin-IR axon megoszlási mintázatot tárt fel a *post mortem* női agyakból származó mintákban. Míg a hipotalamusz III. agykamrához közeli, mediális területei bőségesen tartalmaztak kisspeptin-IR axon varikozitásokat, jelölt rostok csak elvétve jelentek meg a laterálisabb hipotalamusz régiókban. Különösen gazdag rostozat volt megfigyelhető a periventrikuláris, paraventrikuláris és infundibuláris magokban (**21/1-3. ábrák**). A rágszálóagy viszonyaitól eltérően, gazdag perikapilláris rostfonat jelent meg az EM portális kapillárisai körül is (**21/1F ábra**), felvetve a kisspeptin neuroszekréció lehetőségét a humán hipofízis portális keringésébe. A kisspeptint termelő neuronok perikaryonja az anti-humán kisspeptin-54 antitest használatával vált láthatóvá (**21/3. ábra**). A neuronok zöme a nucleus infundibularisban jelent meg (**21/3D ábra**). Egy kevésbé intenzív festődésű, ám számbelileg jelentős további sejtcsoport a rostrális periventrikuláris területen is megfigyelhető volt, a kis- és nagysejtes paraventrikuláris idegmagvakkal átfedő anatómiai megoszlásban (**21/3A és B ábrák**). Topográfiai helyzete alapján, ez a neuron populáció megfelelhet a rágszálókban azonosított RP3V pozitív ösztrogén visszacsatolásért felelős (Herbison, 2008) kisspeptin sejtcsoportjának.

A humán hipotalamikus kisspeptin neuronrendszer - rágszálókból nyert adatok alapján megjósolt - szexuális dimorfizmusát férfiaktól és nőktől származó szövetminták párhuzamos immuncitokémiai vizsgálatával vetettük fel (**21/4. ábra**). A férfiaktól származó minták többsége igen kevés kisspeptin-IR idegrostot tartalmazott. A női és férfi minták közti különbség kvantitatív elemzése ( $0,0625 \text{ mm}^2$  területre vonatkoztatott rost számok összehasonlítása) igazolta, hogy azonos területen a női minták 4-7-szer több idegrostot tartalmaznak, mint a férfiaktól származó hipotalamusz metszetek (nucleus infundibularis:  $F_{1,7} = 9,42$ ,  $P = 0,018$ ; nucleus periventricularis:  $F_{1,8} = 14,87$ ,  $P = 0,005$ ; ANOVA). Hasonlóan robusztus volt a nemek különbsége, amikor a nucleus infundibularis  $0,25 \text{ mm}^2$ -nyi területein a kisspeptin-IR perikaryonok számát vetettük össze, ami a női mintákban 6-7-szer volt nagyobb ( $F_{1,7} = 35,72$ ,  $P = 0,0006$ ; ANOVA). A megfigyelés érdekessége, hogy a nucleus infundibularissal analóg ARC kisspeptin rendszerének rágszálókban nincs jól látható

nemi dimorfizmusa (Clarkson & Herbison, 2006). Az RP3V területén kisszeptin-IR sejttetek kizárólag nőkből származó mintákban voltak láthatóak. A megfigyelés rámutat, hogy emberben is létezik egy rágcslók RP3V-beli kisszeptin neuronjaival analóg sejtcsoport, ami a rágcslókéval azonos irányú, jelentős mérvű nemi dimorfizmust mutat.

Immuncitokémiai kettős-festésen alapuló vizsgálataink a kisszeptin és GnRH neuronrendszerek közti kontaktusok helyeit és számát vizsgálták **(21/4. ábra)**. A GnRH-IR sejttetekben női mintákban  $0,7 \pm 0,5$  (átlag $\pm$ SEM), férfiakból származó mintákban  $0,12 \pm 0,05$  kontaktus volt látható. Női mintákban a GnRH idegsejtek  $25,8 \pm 15,0\%$ -ának, férfi mintákban  $8,3 \pm 3,6\%$ -ának felszínén volt kisszeptin-IR axon kontaktus megfigyelhető. Hasonlóan, axo-dendritikus kapcsolatok is jelen voltak mindkét nemből, és az EM területén vékony kaliberű kisszeptin-IR axonok gyakori axo-axonális kontaktust is képeztek GnRH-IR axonokkal **(21/4I ábra)**.

#### Neurokinin B és kisszeptin idegsejtek kapcsolatának vizsgálata humán hipotalamuszban **(21)**

Női hipotalamikus szövetmintákon elvégzett immunfluoreszcens vizsgálataink a kisszeptin és neurokinin B feltételezett kolokalizációját vizsgálták egy új, anti-humán preproneurokinin B antitest használatával. Először egyes-jelölés és peroxidáz-alapú immuncitokémia alkalmazásával feltérképeztük a humán hipotalamikus neurokinin B rendszert **(21/5. ábra)**, mely kiterjedtebb rost és sejttest megoszlást mutatott, mint a kisszeptin neuronrendszer. Nagyszámú perikaryon volt látható a stria terminalis magjában, a Broca-féle diagonális köteg mentén és a nucleus infundibularisban, de elsórt immunpozítív sejtek a nucleus periventricularisban is megjelentek. A kettős-immunfluoreszcens vizsgálatok megmutatták, hogy a nucleus infundibularis kisszeptin- és neurokinin B-IR perikaryonjai többségükben azonosak **(21/6A-C ábrák)**. A kisszeptin-IR axonoknak egy régió függvényében változó hányadában szintén megjeleníthető volt a neurokinin B immunjel **(21/6D-I ábrák)**. Ez az arány a nucleus infundibularisban  $56,5 \pm 7,8\%$ , a nucleus periventricularisban  $13,6 \pm 7,9\%$  volt, míg neurokinin B nem volt jelen kisszeptin neuronok extrahipotalamikus rostvetületeiben a laterális szeptumban. Az eltérő kolokalizációs arányok arra utalnak, hogy a különböző kisszeptin sejtpopulációk nem azonos mértékben járulnak hozzá a vizsgált területek beidegzéséhez. Az RP3V-vel analóg terület kisszeptin sejttestjeinek immunfluoreszcens vizsgálata technikai okokból nem volt lehetséges. Rágcslókban és birkában tett észleletek (Goodman *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2009) azonban azt valószínűsítik, hogy emberben is ezek a neuronok jelenthetik a neurokinin B-t nem tartalmazó kisszeptin idegrostok forrását.

#### Endokannabinoid szignalizáció tanulmányozása GnRH idegsejtek GABAerg afferenseiben **(13, 23)**

Vizsgálataink egyik célja a hipotalamusz CB1-IR beidegzésének tanulmányozása volt, fény- és elektronmikroszkópos immuncitokémia alkalmazásával. Egy további morfológiai és elektrofiziológiai kísérletsorozatban a GnRH neuronrendszer GABAerg afferenseit befolyásoló endokannabinoid szignalizációt vizsgáltuk.

Immuncitokémiai eredményeinket egy új CB1 antiszérum használatával nyertük (Fukudome *et al.*, 2004). Fénymikroszkópos megfigyeléseink alapján **(13/1. és 2. ábrák)**, a hipotalamikus magok többsége meglepően bő CB1-IR beidegzést nyert, melyet korábbi tanulmányok nem tudtak megjeleníteni. Különösen dús innervációt kapott az elülső hipotalamikus area, az MPOA, a PVN, a nucleus dorsomedialis, a nucleus ventromedialis és a nucleus supramammillaris. A CB1-IR rostok ugyanakkor alacsony számban jelentek meg az SON, a nucleus suprachiasmaticus és a nucleus mammillaris lateralis területén. Az immuncitokémiai jel specifitását CB1-génkiütött egér agyszövet - mint negatív kontroll - használatával igazoltuk **(13/2K ábra)**. Ultrastrukturális szinten a legintenzívebb CB1

immunjelet a jelölt axonok preterminális/terminális szegmentumában figyeltük meg (**13/3 és 13/4 ábrák**). A CB1-IR terminálisok PVN területén elvégzett elemzése 50 szinapszis közül 28 esetében a glutamaterg fenotípusra jellemző aszimmetrikus, míg 22 esetében a GABAerg fenotípusra jellemző szimmetrikus morfológiát igazolt. Hasonló számarányokat találtunk az ARC területén is.

GnRH-GFP idegsejtek elektrofiziológiai vizsgálata során a CB1 agonista WIN55,212 csökkentette a GnRH idegsejtek spontán tüzelési frekvenciáját (**23/1A ábra**). Ez a hatás ionotrop glutamát receptorok gátlása (2 mM kinurénsav) mellett is kimutatható volt, de a GABA<sub>A</sub> receptorokat blokkoló bikukullin (20 $\mu$ M) szelethez adását követően megszűnt (**23/1C ábra**), a GABA közvetítő szerepét igazolva. Morfológiai vizsgálatokkal valóban sikerült is kimutatni GnRH idegsejtekkel szinapszist képező CB1-IR axon végződéseket, melyek egy része - a GABAerg transzmisszióra jellemző - szimmetrikus morfológiát mutatott (**23/3. ábra**). Whole-cell patch-clamp vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a GnRH idegsejtekre érkező GABAerg miniatűr posztzinaptikus áramok frekvenciáját a CB1 agonista WIN55,212 lecsökkenti (**23/4 B, D ábrák**). A CB1 antagonistá AM251 (1 $\mu$ M) önmagában alkalmazva növelte a frekvenciát, mely egy GABAerg bemeneteket gátló endokannabinoid tónus fennállására utalt (**23/5 ábra**). A 2-AG szintézist gátló tetrahydrolipstatin jelenléte az intracelluláris oldatban a gátló tónust megszüntette, jelezve, hogy a preszinaptikus CB1-en ható ligandum forrása maga a GnRH idegsejt (**23/5 ábra**).

### Megbeszélés

A reprodukció szabályozásában a központi idegrendszer kimeneti jelét a hipofízis felé a GnRH pulzatilis szekréciója jelenti. A keringő ösztrogén és androgén hormonok szintje, metabolikus-, cirkadián- és stressz szignálok, szezonális szaporodású fajoknál a napszakok hosszának változása mind a pulzatilis GnRH szekréció mintázatát módosítva hat az adenohipofízis és a gonádok működésére. A GnRH idegsejtek összehangolt szekréciós aktivitásán alapuló pulzatilitást afferens bemenetek szabályozzák. Az afferensekben működő átvivőanyagok némelyike obligát a GnRH pulzus generátor pubertás kori beindításához vagy a fertilitás fenntartásához. Így a kisspeptin/GPR54 (Seminara *et al.*, 2003) vagy a neurokinin B/NK3 (Topaloglu *et al.*, 2009) jelátvitel hiánya nem kompenzálható, hipogonadotrop hipogonadizmussal jár. Patológias körülmények közt hasonlóan hatékonyan mutatkozik az NPY által közvetített gátló szabályzás is. A leptin-deficiens *ob/ob* egerek infertilisek (Mounzih *et al.*, 1997), ám reprodukív fenotípusuk jelentősen javítható az NPY-génkiütött egerekkel való keresztezéssel (Erickson *et al.*, 1996), rámutatva, hogy *ob/ob* egerben a reprodukív tengely gátlásában a megnövekedett NPY tónusnak kitüntetett szerepe van. A felszálló noradrenerg pályarendszerek átmetésével patkányban ugyancsak megelőzhető az LH surge jelentkezése, ám ez esetben 3 hét elteltével az ép funkció noradrenerg szabályozás hiányában is visszatér (Clifton & Sawyer, 1979), a kiesést kompenzáló plaszticitást jelezve. A GnRH idegsejtekkel kommunikáló afferens rendszerek feltárása elengedhetetlen a GnRH pulzus generátor szabályozásának megértéséhez. E fejezetben szereplő munkáinkban morfológiai és farmakológiai megközelítésekkel igazoltuk a hisztaminerg rendszer részvételét a pozitív ösztrogén visszacsatolásban (**1**). Bizonyítottuk, hogy a GnRH idegsejteket beidegző NPY-IR afferensek fele az ARC-ból ered, AGRP-t tartalmaz, és szimmetrikus szinapsziseket képez. Noradrenerg marker enzimet tartalmazó NPY tartalmú afferensek is jelentős arányban (25%) járulnak hozzá a GnRH idegsejteken megfigyelhető NPY-IR kontaktusok képzéséhez (**5**). Számos kolinerg appozíciót is megfigyeltünk GnRH idegsejteken (**16**), melyekben a szinaptikus specializáció gyakori hiánya a nem-szinaptikus jelátviteli mechanizmusra (Vizi & Kiss, 1998) utalt. A humán kisspeptin neuronrendszer tanulmányozása során elsőként figyeltünk meg egy rágcslók RP3V területével analóg, szexuálisan dimorf idegmagot és kisspeptin sejtcsoportot. Az észlelet alapján felvethető, hogy a jelenleg elfogadott nézettel

szemben (Knobil, 1980), a pozitív ösztrogén visszacsatolás emberben nem teljes egészében az infundibuláris magban játszódik. A humán nucleus infundibularis (ARC) kisszeptin idegsejtjeinek általunk megfigyelt, igen nagyfokú szexuális dimorfizmusa rágsálókban nem volt ismert. Ugyancsak rágsálóktól eltérően, humánban a portális erek körül is megfigyeltünk kisszeptin-IR rostokat, továbbá a kisszeptin rostok axo-axonális kontaktusokat létesítettek GnRH terminálisokkal az EM-ben (21). Az utóbbi kapcsolat típus megmagyarázza a kisszeptinek LH szekréciót fokozó hatását *iv.* injekciót követően (Shahab *et al.*, 2005). Egyúttal előrejelzi, hogy GPR54-en ható, új terápiás készítmények a GnRH szekréciót a vér-agy gáton kívül hatva is képesek lesznek befolyásolni. A neurokinin B kimutatása a humán nucleus infundibularis kisszeptin neuronjaiban (21) a rágsálóban és juhban tett korábbi megfigyelésekkel (Goodman *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2009) analóg jelenséget takar. Mivel a GnRH idegsejteket a glutamátion kívül a GABA is serkenti (DeFazio *et al.*, 2002), a GABAerg terminálisokon - részben tónusosan ható - retrográd endokannabinoid szignalizáció, melyet kombinált morfológiai, farmakológiai és elektrofiziológiai megközelítésekkel tártunk fel, különösen fontos élettani mechanizmust képviselhet a GnRH idegsejt működésének gátló szabályozásában (23). A gátló mechanizmus jelentőségét a metabolikus-, szteroid hormone-, és cirkadian jelek átvitelében további vizsgálatok hivatottak feltárni. Az értekezés keretein belül vizsgált afferens rendszereket az **I. Ábra** foglalja össze.

#### IV/2. Direkt ösztrogén visszacsatolás igazolása GnRH neuronokban: A “ $\beta$ ” típusú ösztrogén receptor szerepe

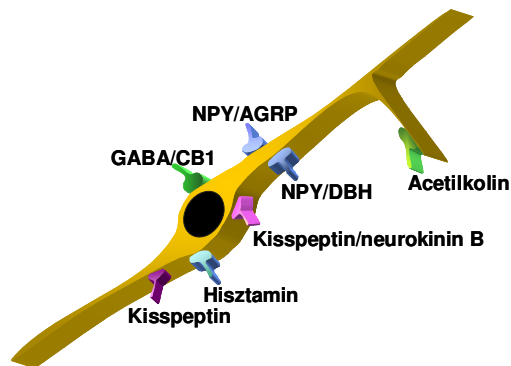
A GnRH idegsejtekre gyakorolt pozitív és negatív ösztrogén visszacsatolás (Herbison, 1998) mechanizmusa kezdetektől fogva a reproduktív neuroendokrinológia központi kérdése volt. Mióta Shivers és munkatársai leírták a tríciummal megjelölt E2 *in vivo* kötéseinek hiányát patkány GnRH neuronjaiban (Shivers *et al.*, 1983), a kutatások középpontjában az E2 hatást közvetítő interneuronok keresése állt. Az ER- $\beta$  felfedezésével (Kuiper *et al.*, 1996) izgalmas lehetőségként ismét felmerült a GnRH idegsejtek direkt, ER- $\beta$  közvetítette E2 érzékenysége. ER- $\beta$  antitestek hiányában, első kolokalizációs vizsgálatainkat *in situ* hibridizációs kettős-jelöléssel végeztük.

Az alacsony kópiaszámú ER- $\beta$  mRNS egy-sejt szintű kimutatása metodikai kihívást is jelentett. Alábbiakban ezért egy érzékenyített izotópos hibridizációs módszertan kidolgozását is leírjuk, melyet kettős-jelöléshez adaptálva, sikerrel vizsgáltuk ER- $\beta$  megjelenését GnRH idegsejtekben.

A GnRH idegsejtek direkt ösztrogén-érzékenységét ligandum kötési vizsgálatokkal is elemeztük, majd a közben kifejlesztett ER- $\beta$  antitestek használatával, immuncitokémiával is felvetettük, mind patkányban mind emberben.

A továbbiakban az E2 genomikus hatásainak kimutatására microarray vizsgálatokat végeztünk a - GnRH neuronok egy *in vitro* modelljét jelentő - GT1-7 sejtvonalon.

Egy korábbi munkánkban kimutattuk az ER- $\beta$  előfordulását a PVN és az SON OT és VP neuronjaiban (Hrabovszky *et al.*, 1998). A megfigyelés igazolta, hogy a magnocelluláris neuronok direkt módon is ösztrogén-érzékenyek. A receptor expresszió



**I. Ábra. GnRH neuronok újonnan feltárt afferensei**

ugyanakkor egyenetlenül oszlott meg az OT és VP neuronok anatómiaiailag és funkcionálisan is igen heterogén csoportjai között. Ezért az értekezésben szereplő egyik munkánk az ER- $\beta$  tartalmú hipotalamikus OT és VP idegsejtek finomabb topográfiai analizisét tűzte ki célul (6). E tanulmányunkban megvizsgáltuk a kolokalizációs jelenséget a humán hipotalamusz OT és VP sejtjeire vonatkozóan is (6).

#### Új *in situ* hibridizációs eljárás kidolgozása alacsony kópiaszámú mRNS-ek hisztokémiai kimutatására (4)

A kénizotóppal ( $^{35}\text{S}$ ) jelölt hibridizációs próbák eredményes alkalmazásának egy gyakori korlátja a magas aspecifikus háttér képződése, mely ditiotreitolt (DTT; 10-100 mM) hibridizációs pufferhez adásával mérsékelhető. A hibridizációs módszertan javítását célzó teszt vizsgálatainkban a szokásosnál egy nagyságrenddel magasabb koncentrációjú (750-1000 mM) DTT jelenléte további háttércsökkenést és javuló jel/háttér arányt eredményezett (4/1. ábra). Ilyen pufferben a megszokottnál jóval több izotóppal jelölt próba hozzáadása sem okoz háttér képződést (4/2. ábra). A próba koncentráció többszörösére emelésekor (4/3. ábra) a jel meglepő mértékű erősödést mutatott. Az észlelettel bizonyítottuk, hogy a háttér megfelelő kontrollja mellett (1000 mM DTT használata) a hibridizációs jel erőssége a próba mennyiség emelésével javítható. A továbbiakban igazoltuk, hogy magas próbakonzentráció, ennek alternatívájaként, a hibridizációs pufferben megemelt dextrán szulfát koncentráció (20-30%, szemben a rutin módszertanokban használt 10%-kal), vagy e kettő kombinációja, jelentősen javítja a hibridizációs jel erősségét (4/3. ábra). A jelölt neuronok egy-sejt szintű kimutathatósága ennek eredményeképp autoradiográfiás emulzióan oly mértékben javulhat, hogy lehetővé teszi alacsony kópiaszámú mRNS-ek megjelenítését is (4/4. ábra). Igazoltuk, hogy további jelnövekedés érhető el a hibridizációs idő megnövelésével is (40 h, a rutin 12-16 h hibridizációs idővel szemben; 4/7. ábra). A magas DTT, dextrán szulfát és próba koncentráció, továbbá a megnyújtott hibridizációs idő a következőkben tárgyalt kettős-*in situ* hibridizációs vizsgálatokban a sikeres kolokalizáció kulcsa volt (2, 3, 6-11).

#### ER- $\beta$ mRNS expresszió igazolása patkány GnRH neuronjaiban (2, 3)

Kettős-*in situ* hibridizációval mRNS szinten is megerősítettük mások immuncitokémiai eredményeit, melyek szerint a patkány GnRH neuronjai jelentős mennyiségű ER- $\alpha$ -t nem termelnek (Herbison & Theodosis, 1992) (2/a-c ábrák). Laflamme és mtsai korábban publikált megfigyelésével szemben, mely az ER- $\beta$  mRNS expresszió hiányát mutatta GnRH neuronokban (Laflamme *et al.*, 1998), javított hibridizációs módszertanunkkal a GnRH idegsejtek többségében sikerült megjeleníteni az ER- $\beta$  mRNS termelődését (2/d-i ábrák). A kolokalizáció aránya ovariektomizált (67,2 $\pm$ 1,8%) és ovariektomizált majd E2-vel szubsztituált (73,8 $\pm$ 4,2%) patkányokban, továbbá hím és nőstény patkányokban (3/1. ábra) nem mutatott szignifikáns eltérést.

#### Ösztrogén receptor ligandum kötésének megjelenítése patkány GnRH neuronjaiban (2)

Az ER- $\beta$  altípust kódoló mRNS szelektív jelenlétének kimutatása után célunk funkcionális ösztrogén receptor fehérje termelődésének igazolása volt a GnRH idegsejtekben. Shivers és mtsai 1983-ban tríciummal jelölt E2-t használtak az ösztrogén felvétel hiányának kimutatására (Shivers *et al.*, 1983). Ennél érzékenyebb megközelítésre törekedve, az *in vivo* ligandum kötés megjelenítésére mi rövidebb félféletidejű radioizotópot alkalmaztunk. A felvett izotop autoradiográfiás megjelenítését a GnRH immuncitokémiai kimutatásával ötvöztük. A preoptikus terület GnRH idegsejtjeinek 8,8%-ában sikerült kimutatni 17 $\alpha$ -iodovinil-11 $\beta$ -metoxiösztrodiol ( $^{125}\text{I}$ -ösztrogén) *in vivo* felvételét (2/l. ábra). A kötés specifitását igazolta, hogy jelöletlen E2 előzetes injekciójával a  $^{125}\text{I}$ -ösztrogén felvétele teljesen kiküszöbölhető volt.



### Nukleáris ER- $\beta$ fehérje megjelenítése immuncitokémiával patkány GnRH neuronjaiban (3)

Az ER- $\beta$  megbízható immuncitokémiai kimutatását GnRH idegsejtekben sokáig késleltette a jó minőségű, specifikus antitestek hiánya. A Zymed cég nyúlban termelt poliklonális antiszéruma (Z8P) az ER- $\beta$  immunreaktivitás megoszlását az *in situ* hibridizációs kísérletekből is ismert területeken mutatta, a nukleáris receptorokra jellemző sejtmagi lokalizációban (Shughrue & Merchenthaler, 2001).

Fekete színű, ezüst-amplifikált Ni-DAB és barna színű DAB kromogén kombinációt használva kettős-immuncitokémiai vizsgálatainkban, a nukleáris ER- $\beta$  immunreaktivitást ovariektomizált patkányok GnRH idegsejtjeinek  $87,8 \pm 2,3\%$ -ában sikerült kimutatnunk. Hasonlóan magas kolokalizációs arányt figyeltünk meg E2-szubsztituált ovariektomizált nőstény ( $74,9 \pm 3,2\%$ ) és intakt hím ( $85,0 \pm 4,7\%$ ) patkányokban (**3/1. ábra**).

### Az ER- $\beta$ immuncitokémiai kimutatása emberi hipotalamusz minták GnRH idegsejtjeiben (15)

Egy magánforrásból származó, korábban karakterizált poliklonális anti-humán ER- $\beta$  antitest (Saunders *et al.*, 2000) használata lehetővé tette, hogy immuncitokémiával felvessük a patkányokon tett megfigyelések emberi relevanciáját. A Semmelweis Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetével kollaborációban elvégzett, kettős-immuncitokémiai vizsgálatok férfi kadáverekből származó hipotalamusz minták GnRH neuronjainak  $10,8\text{--}28,0\%$ -ában kimutatták a nukleáris ER- $\beta$  jelenlétét. Az ER- $\alpha$  hiányát mutató korábbi vizsgálatokkal együtt (Rance *et al.*, 1990), eredményeink megmutatták, hogy rágsálókhoz hasonlóan, a humán GnRH idegsejtek is szelektíven expresszálják az ER- $\beta$  receptor izoformát. Így az ER- $\beta$  emberi GnRH idegsejteken is egy közvetlen ösztrogén visszacsatolási mechanizmus molekuláris alapját jelentheti.

### E2-regulált gének és szignalizációs útvonalak azonosítása a GnRH-t termelő GT1-7 sejtvonalban microarray módszerrel (18)

Microarray vizsgálatainkban a GT1-7 sejtek mintegy 1000 génje mutatott az E2 kezelés hatására megváltozott expressziót. A változásokat különböző időbeli lefutás jellemezte (**18/3. ábra**). A legkorábban jelentkező válaszok már 0,5-2 órával a kezelést követően látszóttak, míg a késői válaszok a 24-48 órás kezelési csoportokban mutatkoztak. Az E2 kezelés következményeképp aktivált gének közt számos transzkripciósfaktort, neurotranszmittert, neuromodulátort, azok receptorait, ion csatornát és transzportert azonosítottunk (**18/36. táblázatok**). A változások egy részét RT-qPCR-rel erősítettük meg.

### ER- $\beta$ megoszlásának leírása OT-t és VP-t termelő hipotalamikus neuronok csoportjaiban patkányban és emberben (6)

Egy korábbi, immuncitokémiát és *in situ* hibridizációt ötvöző tanulmányunkban már kimutattuk, hogy az ER- $\beta$  mRNS megjelenik a patkány - ER- $\alpha$ -t nem tartalmazó - OT és VP idegsejtjeinek egyes csoportjaiban (Hrabovszky *et al.*, 1998). A jelenség finomabb anatómiai analízisét patkány és humán hipotalamuszban immuncitokémiával folytattuk. A patkányra vonatkozó megfigyeléseket hármasszoros *in situ* hibridizációs vizsgálatokkal is kiegészítettük.

Az ER- $\beta$  immuncitokémiai kimutatását követő topográfiai elemzés a legintenzívebb ER- $\beta$  festődést a PVN egyes vegetatív almagjaiban mutatta ki. Ezek a mediális parvicelluláris almag ventrális és dorzális alegységei, továbbá a laterális parvicelluláris almag voltak (**6/1. ábra**), melyekben az intenzív magfestődés OT-IR neuronokban jelent meg (**6/2J és K ábrák**). A második legerősebb ER- $\beta$  jelet az SON magnocelluláris vazopresszin idegsejtjeiben, valamint a PVN hátsó magnocelluláris almagjának vazopresszin idegsejtjeiben észleltük (**6/1. és 6/2F, L és O ábrák**). Mivel az OT és VP neuronok szinte valamennyi

csoportja magas százalékban tartalmazta az ER- $\beta$ -t, a jel-intenzitást a százalékos megjelenési aránynál jellemzőbb paraméternek ítéltük, és négyes-skálán, táblázatos formában, almagonként értékeltük. Kiemelendő a magnocelluláris OT neuronok jellemzően gyenge vagy közepes szintű ER- $\beta$  immunfestődése, szemben a magnocelluláris VP neuronok intenzív jelölődésével (**6/1. táblázat; 6/2E ábra**).

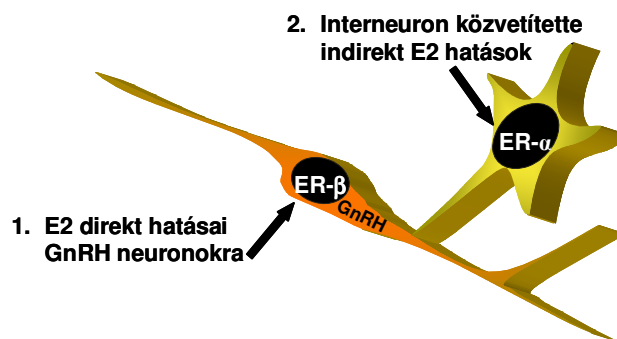
A Z8P antitesttel tett fenti megfigyeléseket kiegészítettük és megerősítettük egy általunk kidolgozott, hármas-*in situ* hibridizációs módszerrel. Digoxigeninnel, fluoreszceinnel és kénizotóppal ( $^{35}\text{S}$ ) jelölt cRNS próbák együttes kimutatását alkalmazva, magas kolokalizációs százalékot és differenciált ER- $\beta$  expressziót tártunk fel a hipotalamusz OT és VP idegsejtjeinek különböző funkcionális alcsoportjaiban (**6/4. ábra**).

A humán kolokalizációs viszonyok tisztázására a Semmelweis Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetével kollaborációban végeztünk immuncitokémiai vizsgálatokat. Mind OT, mind VP neuronok csoportjaiban sikerrel mutattuk ki az ER- $\beta$  immunreaktivitást az SON és a PVN területén (**6/5. ábra**).

### Megbeszélés

Megfelelő jel/háttér arány esetén, röntgen filmen az alacsony expressziójú mRNS-ek is vizsgálhatóak hosszú autoradiográfiás expozíciós idő megválasztásával. Gyakori tapasztalat azonban az, hogy ugyanezekben a metszetekben az adott mRNS-t expresszáló egyedi idegsejtek megjelenítése fotóemulzióon sikertelen marad. Ez a probléma az autoradiográfiás ezüst szemcsék túlságosan gyenge, jelként nem értékelhető csoportosulásaként, vagy alacsony jel/háttér arányként jelentkezik. Technikai megoldás keresésekor azt a nézetet vizsgáltuk felül, miszerint a rutin izotópos hibridizációs módszerek biztosítják a maximális hibridizációs jelerősséget és a szöveti mRNS molekulák „telítéséhez” szükséges feltételeket. Az általunk javasolt gyakorlati megoldások, mint a megemelt DTT, dextrán szulfát és próba koncentráció, továbbá a megnyújtott hibridizációs idő alkalmazása, az értekezésben tárgyalt kettős-*in situ* hibridizációs vizsgálatokban az eredményes kolokalizáció kulcsa volt (**2, 3, 6-11**). Elvi szempontból is fontos volt cáfolni azt az elterjedt hiedelmet, hogy rutin hibridizációs módszerekkel telíteni lehet a szöveti mRNS molekulákat. Egyik elméleti következtetésünk, hogy az *in situ* hibridizáció sebessége nem csupán a detektált mRNS molekulák szöveti mennyiségétől, hanem a próba koncentrációtól is függ. Ennek megfelelően, a reakció kinetikája nem elsőrendű, mint azt *in vitro* hibridizációs reakciók vizsgálata alapján korábban feltételezték. Fixált szövetben a próba diffúzió lassúsága és az mRNS korlátozott hozzáférhetősége magyarázhatja megfigyeléseinket (**4**).

Az ER- $\beta$  mRNS és immunreaktivitás valamint az *in vivo*  $^{125}\text{I}$ -ösztrogén kötés kimutatása GnRH idegsejtekben cáfolt egy régi dogmát, mely szerint a GnRH idegsejtek közvetlenül nem képesek az E2 szintek érzékelésére (Shivers *et al.*, 1983). A vizsgálataink óta azonosított, valószínűleg ER- $\beta$  közvetítette, direkt (részben gyors, részben magreceptorok által mediált) ösztrogén hatások közt szerepel a cAMP response element-binding protein foszforilációja (Abraham *et al.*, 2003), intracelluláris kalcium oszcillációk stimulációja (Temple *et al.*, 2004), galanin génexpresszió indukciója (Merchenthaler, 2005) és a GnRH-GFP neuronok ingerlékenységének fokozása (DeFazio & Moenter, 2002). A



**II. Ábra. Ösztrogén visszacsatolás direkt és indirekt útja**

GnRH neuronok *in vitro* modelljét jelentő GT1-7 sejteken elvégzett microarray kísérletek eredményei részleges betekintést nyújthatnak azon genomikus változásokba is, melyeket az E2 GnRH neuronokban *in vivo* indukálhat. A direkt hatások mellett azonban az ER- $\alpha$  tartalmú interneuronok által közvetített indirekt hatások is fontos szerepet játszanak a reprodukció szabályozásában. Ezt támasztja alá az ER- $\alpha$ -génkiütött egerek infertilitása (Korach *et al.*, 1996). Az ösztrogén visszacsatolás ER- $\beta$  által közvetített direkt, és nagyrészt ER- $\alpha$  által közvetített, indirekt útjait a **II. Ábra** vázolja sémásan. Az ER- $\beta$  receptor altípus szelektív előfordulása GnRH idegsejtekben felveti annak jövőbeli lehetőségét, hogy a GnRH pulzus generátort ER- $\beta$ -szelektív ligandumokkal is befolyásolni lehet. A leírt jelenség humán relevanciájának megerősítése egyik munkánkban (**15**) ezért különös jelentőségű.

Saját korábbi, immuncitokémiát és *in situ* hibridizációt ötvöző munkánk igazolta az ER- $\alpha$ -t nem expresszáló (Simerly *et al.*, 1990) hipotalamikusan OT és VP idegsejtek ER- $\beta$  tartalmát (Hrabovszky *et al.*, 1998), magyarázatot kínálva a két rendszer működésének régóta ismert ösztrogén érzékenységre (Van Tol *et al.*, 1988; Jirikowski *et al.*, 1988; Skowsky *et al.*, 1979; Van Tol *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1995; Negoro *et al.*, 1973). Az OT és VP fenotípusú hipotalamikusan neuronok szerepe azonban rendkívül szerteágazó. ER- $\beta$  tartalmuk részletes elemzésével (**6**) pontos képet adtunk arról, hogy mely funkcionális alcsoportok, és milyen mértékben ösztrogén érzékenyek. Érdekes módon, a magnocelluláris neuronok közül a VP-t termelők mutattak lényegesen erősebb ER- $\beta$  jelet. A legintenzívebb receptor festődés a PVN vegetatív almagjainak OT neuronjait jellemezte. A vizsgálat egy további fontos eredménye volt a kolokalizációs jelenség humán relevanciájának igazolása (**6**).

#### **IV/3. Glutamáterg (VGLUT2) fenotípus megjelenítése GnRH neuronokban és további neuroszekretoros rendszerekben**

##### Glutamáterg (VGLUT2) fenotípusú neuroszekretoros idegsejtek lokalizálása (**12**)

Az első vizsgálatok célja az EM külső, vér-agy gát mentes zónáját és a neurohipofízist beidegző VGLUT2-IR idegrostok (Lin *et al.*, 2003) forrásának azonosítása volt. Hím patkányokon elvégzett kísérleteinkben FluoroGoldot juttattunk a szisztémás vérkeringésbe (*ip.* injekció), a vér-agy gát mentes területekre vetítő neuronok, köztük a hipotalamusz neuroendokrin sejtjeinek szelektív megjelölésére. Ezt követően, a perikaryonokban felhalmozódó FluoroGold immunfluoreszcens kimutatását ötvöztük a VGLUT2 mRNS *in situ* hibridizációs megjelenítésével. További immuncitokémiai kísérletek a VGLUT2 immunreaktivitás axonokon belüli, szubcelluláris megoszlását vizsgálták az EM külső zónájában és a - magnocelluláris neuroszekretoros idegvégződéseket tartalmazó - hátsó hipofízislebeny területén.

Eredményeink FluoroGold immunreaktivitás és VGLUT2 mRNS expresszió együttes előfordulását az OVLT, a PVN (kis- és nagysejtes alegységek), a nucleus periventricularis és az SON területén mutatták. Ezzel szemben, az ARC FluoroGold-pozitív neuronjai VGLUT2 hibridizációs jelet nem tartalmaztak (**12/1A-K ábrák**).

A neuroendokrin axonok mindkét végződési területén, az EM külső zónájában és a hátsó hipofízislebenyben, a mikrovezikula marker, SV2 és a VGLUT2 immunreaktivitás egyaránt kimutatható volt, egymással átfedő megoszlásban. Az SV2 és a VGLUT2 immunfluoreszcens jelek a perikapilláris térség közvetlen környezetében voltak legerősebbek (**12/1L-W ábrák**). Az immunarany módszerrel kimutatott VGLUT2 immunreaktivitás elektronmikroszkópos vizsgálata igazolta, hogy a VGLUT2 mindig szinaptikus vezikulák környezetében jelenik meg a kis- és nagysejtes neuroszekretoros rendszerekben. A jelölt mikrovezikula csoportok legjellemzőbben a perikapilláris térség szomszédságában fordultak elő, míg peptideket tartalmazó „dense-core” granulumok folytonos eloszlást mutattak a neuroendokrin axonvetületek mentén (**12/2. és 3. ábrák**).

### VGLUT2 termelésének *in situ* hibridizációs és immuncitokémiai kimutatása GnRH neuronokban (7)

Az orrplakodban születő GnRH idegsejtek vándorlásuk során - tranziens módon - GABAerg fenotípusúak. Születéskor az előagyba megérkezett GnRH neuronokból a GABA már nem mutatható ki (Tobet *et al.*, 1996). A VGLUT2 mRNS GnRH neuronokéval átfedő megoszlása, a VGLUT2 és a GnRH immunreaktivitás együttes megjelenése az EM külső zónájában (Lin *et al.*, 2003), és neuroendokrin karaktert mutató (vérkeringésbe juttatott FluoroGold-dal megjelölhető; **12**) VGLUT2 idegsejtek előfordulása az OVLT és az MPOA területén felvetették, hogy a felnőtt patkányok GnRH neuronjai glutamaterg fenotípusúak lehetnek.

*In situ* hibridizációs kettős-jelölés alkalmazásával felnőtt, hím patkányok GnRH neuronjainak közel 100%-ában igazolni tudtuk a VGLUT2 mRNS expresszióját (**7/1A és B ábrák**).

Konfokális mikroszkóppal vizsgálva az EM külső, paliszád zónáját és az OVLT-t, a GnRH-IR axonokban sikerült a VGLUT2 immunreaktivitást is kimutatni (**7/1D-G ábrák**). A VGLUT2 szubcelluláris megoszlása az EM-ben (**12/2. ábra**) valószínűsítette, hogy a VGLUT2 a GnRH axonokban is mikrovezikuláihoz asszociált, melyek legnagyobb számban a valódi axonvégződéseken fordultak elő.

### Egyéb neuroszekretoros rendszerek aminosav fenotípusának azonosítása (8-10)

A fenti tanulmányban használthoz hasonló, kettős- és hármass-*in situ* hibridizációs megközelítést használtunk a többi klasszikus neuroendokrin rendszer aminosav neurotransmitter fenotípusának vizsgálatára is.

Ezen tanulmányokban bebizonyítottuk, hogy VGLUT2 mRNS termelődik a PVN kissejtes CRH és TRH neuronjaiban (**8/2A-L ábrák**), a PVN és a nucleus periventricularis kissejtes szomatosztatin termelő idegsejtjeiben (**9/1B ábra**), továbbá az SON és a PVN nagysejtes OT és VP neuronjaiban (**10/2. ábra**). Ezzel ellentétben, VGLUT2 hibridizációs jel nem volt látható az ARC GHRH idegsejtjeiben (**9/1A ábra**). Az EM metszetein elvégzett kettős-immunfluoreszcens vizsgálatok megerősítették, hogy a CRH-t, TRH-t és szomatosztatint tartalmazó neuroendokrin terminálisok tartalmazzák a VGLUT2 fehérjét (**8/2M és N, 9/1E ábrák**). A glutamaterg markert nem expresszáló GHRH idegsejtek axonjaiban ugyanakkor kimutattuk a GABAerg marker, vezikuláris GABA transzporter jelenlétét (**9/1B ábra**), igazolva Meister és mtsai hasonló, korábbi következtetéseinek helyességét (Meister & Hokfelt, 1988).

### Glutamaterg markerek vizsgálata az adenohipofízis egyes hormontermelő sejtjeiben (11, 20)

A neurohipofízis VGLUT2 immunreaktivitását vizsgálva (**10**), a mellő lebenyi endokrin sejtek egy csoportja is mutatta a glutamaterg idegsejtekre jellemző VGLUT2 immunreaktivitást. Az immuncitokémiai jel több antitesttel is megfigyelhető volt (**11/1A-C ábrák**). A VGLUT2 mRNS *in situ* hibridizációs kimutatásával igazoltuk, hogy az adenohipofízis valóban VGLUT2 molekulát termel (**11/1D és E ábrák**). Későbbi vizsgálataink a VGLUT1 immunreaktivitást is megjelenítették az adenohipofízisben (**20/1A-C ábrák**). VGLUT1-génkiütött egerek használatával és további kontroll megközelítésekkel a VGLUT1 jel specificitását is alátámasztottuk (**20/2-4 ábrák**).

A két VGLUT izoformát expresszáló, nem-neuronális adenohipofízis sejtek hormontermelő fenotípusát kettős-immunfluoreszcens vizsgálatok sorozatban azonosítottuk. A VGLUT2 szelektíven fordult elő az LH-t termelő sejtek közel 93%-ában, az FSH-t termelő sejtek 45%-ában és a thyreoidea-stimuláló hormont termelő sejtek 70%-ában (**11/2 G-I és**

**11/3 ábrák).** A VGLUT1 az adrenokortikotrop hormont termelő sejtek 46%-ában és az LH-t termelő sejtek 8%-ában jelent meg (**20/5A-C, 5I, és 6. ábrák**).

#### Szabályozott VGLUT2 expresszió bemutatása endokrin állatmodelleken (10, 11)

Kvantitatív *in situ* hibridizációval megvizsgáltuk azt a kérdést, hogy a neuroendokrin/endokrin sejtípusokban megjelenő VGLUT2 expressziója az endokrin állapotoktól függően szabályozott-e.

Az SON magnocelluláris vazopresszin neuronjainak krónikus stimulációjára sóterhelést alkalmaztunk, 2% konyhasó 7 napig tartó itatásával. A kettős-*in situ* hibridizációs vizsgálatokat egy új megközelítéssel végeztük el. Ennek során a digoxigeninnel jelölt VP próba immunfluoreszcens kimutatását az izotóppal jelölt VGLUT2 próba autoradiográfiás megjelenítésével ötvöztük. A két interferencia-mentes jel mikroszkópos képét digitalizáltuk és Adobe Photoshop (PSD) file-ok külön rétegeiben, egymásra vetítve kezeltük. A módszer lehetővé tette a VGLUT2 hibridizációs jel kvantitatív elemzését (ezüst szemcsével fedett pixelek számának meghatározása) az egyedi vazopresszin sejtek felett (**10/2E ábra**). A VGLUT2 immunreaktivitás sóterhelést követő megváltozását szintén megvizsgáltuk a neurohipofízisben, a DAB kromogén denzitometriás elemzésével (átlagos szürkeség érték meghatározása).

Az elvégzett kvantitatív képelemzés eredményei alapján megállapítottuk, hogy sóterhelés hatására az SON vazopresszin sejtjeiben a VGLUT2 expresszió jelentős növekedést mutat (**10/3. ábra**). Evvel egyidőben, a neurohipofízis VGLUT2 immunreaktivitása is megnövekszik (**10/3. ábra**).

Az adenohipofízisben a VGLUT2 mRNS főképp a gonadotrop hormonokat termelő sejtekben jelent meg (**11**), melyek ösztrogén-érzékenyek (Mitchner *et al.*, 1998). Ezért felvetettük, hogy ovariektomizált patkányok E2 kezelése hat-e, és miként, a VGLUT2 expresszióra.

A röntgen filmen rögzített hibridizációs jelek denzitometriás elemzésével megállapítottuk, hogy E2 egyszeri *sc.* injekciója szignifikánsan megnöveli az adenohipofízisben a VGLUT2 mRNS expresszióját (**11/4. ábra**).

A VGLUT2 mRNS az adenohipofízis thyreoidea-stimuláló hormont termelő sejtjeiben is jelen volt (**11**), melyek hypothyreoidismusban aktiválódnak. Kísérleteinkben a VGLUT2 expresszióját euthyreoid kontroll, methimazole oldat itatásával hypothyreoiddá tett, valamint napi tyroxin injekciókkal hyperthyreoiddá tett patkányok adenohipofízisében vizsgáltuk meg. A röntgen filmen rögzített hibridizációs jelek összehasonlító elemzését az előző kísérletben leírtakhoz hasonlóan végeztük el.

Euthyreoid és hyperthyreoid állatok VGLUT2 expressziója az adenohipofízisben nem különbözött. Ezzel szemben, hypothyreoidismusban a hibridizációs jel szignifikáns növekedését figyeltük meg (**11/5. ábra**), melyet az immuncitokémiával kimutatható VGLUT2 és thyreoidea-stimuláló hormon ( $\beta$  alegység) immunjelek - fokozott szekrécióra utaló - csökkenése kísért (**11/6. ábra**).

#### Megbeszélés (14, 17)

A perifériás vérből felvett FluoroGold és a VGLUT2 mRNS együttes megjelenítésével feltérképeztük a vér-agy gát-mentes területeket beidegző, glutamáterg neuronok megoszlását (**12**). Mivel az így nyert kép több klasszikus peptiderg neuroszekretoros rendszer perikaryonjainak ismert elhelyezkedésével átfedett, a továbbiakban a GnRH idegsejtekben és további klasszikus neuroendokrin sejtípusokban vizsgáltuk meg - az endogén glutamát használatára utaló - VGLUT2 előfordulását.

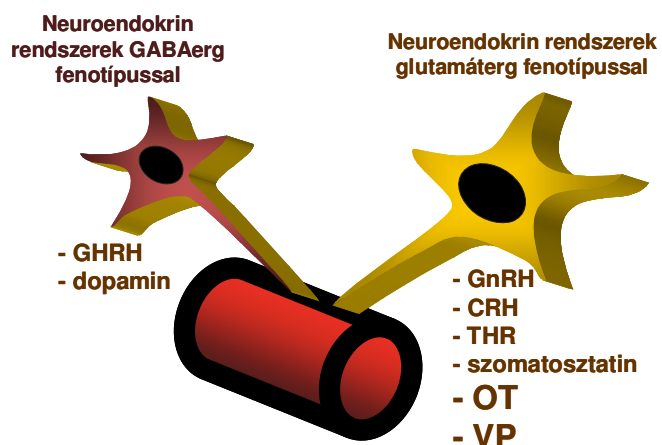
A VGLUT2 sikeres kimutatása GnRH neuronokban az endogén glutamát és a GnRH ko-szekréciójára utal az EM külső zónájában. Mivel glutamáterg agonista szerek serkentik a

GnRH ürülését az EM axonterminálisaiból (Bourguignon *et al.*, 1989; Arias *et al.*, 1993; Kawakami *et al.*, 1998a), feltételezhető, hogy élettani körülmények között az endogén forrásból származó glutamát is hasonlóan képes fokozni a GnRH szekrécióját.

A glutamát receptort hordozó, helyi célsejtek egyrészt lehetnek maguk a neuroendokrin GnRH terminálisok, ami az EM szintjén működő autokrin/parakrin hatásmechanizmusok alapját teremtheti meg. Valóban, a GnRH-IR axonok tartalmaznak is glutamát receptor alegységeket (N-metil-D-aszpartát R1 és a kainát 2)(Kawakami *et al.*, 1998a; Yin *et al.*, 2007). A III. agykamrát határoló tanycyták ugyancsak expresszálnak többféle AMPA és kainát receptor alegységet (Diano *et al.*, 1998; Eyigor & Jennes, 1998; Kawakami, 2000). Így szintén a neuroendokrin terminálisokból ürülő glutamát célsejtjei lehetnek. Végül, a GnRH neuronokból ürülő glutamát hathat a portális érrendszer falát alkotó sejtekre is. Ismert, hogy agyi mikroerek mind ionotrop, mind metabotrop glutamát receptorokat expresszálnak (Krizbai *et al.*, 1998; Gillard *et al.*, 2003).

Funkció tekintetében tudott, hogy a glutamát vagy ionotrop glutamát receptor agonista szerek kalcium-függő GnRH szekréciót váltanak ki az EM *in vitro* preparátumából (Kawakami *et al.*, 1998a). Az EM szintjén ható glutamáterg mechanizmusok szerepet játszanak a pulzatilis GnRH szekréció kialakításában (Bourguignon *et al.*, 1989; Matagne *et al.*, 2005). Eredményeink arra utalnak, hogy az EM-ben a GnRH szekréciót fokozó glutamát legalább részben endogén forrásból, magukból a GnRH terminálisokból származik. Ez autokrin/parakrin mechanizmus révén lehetőséget nyújthat az egyedi GnRH axonok szinkronizált szekréciójának megteremtésére. A részleteiben még nem értett, glutamát kiváltotta folyamatok egyéb hírvivő molekulákat is használhatnak (Bhat *et al.*, 1998; Prevot *et al.*, 2000). Ilyen lehet a nitrogén-oxid, mely az EM-ben főképp endotheliális eredetű és kulcs szerepet játszik a pulzatilitás GnRH szekréció kialakításában (Prevot *et al.*, 2000).

Noha több idegi átvivőanyag előfordulása egyazon neuronban mint kivételes érdekesség került először leírásra (Hokfelt *et al.*, 1977), mára a klasszikus neurotranszmitterek és neuromodulátor peptidek együttes jelenléte idegsejtekben általánosnak tekintett jelenség (Hokfelt *et al.*, 2000). Eredményeink alapján, a szabály alól egyik klasszikus peptiderg neuroszekretoros rendszer sem kivétel. Saját megfigyeléseink (7-10, 12) és mások korábbi észleletei (Meister & Hokfelt, 1988) nyomán kirajzolódott a teljes kép a klasszikus neuroendokrin rendszerek aminosav neurotranszmitter fenotípusát illetően (III. Ábra). Az endogén glutamát több rendszerben (GnRH, CRH, TRH, szomatosztatin, OT) hasonló, de részleteiben még nem ismert mechanizmussal járulhat hozzá a pulzatilis szekréciós mintázatok kialakításához. A glutamát további hatásai befolyásolhatják glia sejtek (tanycyták, pituicyták) morfológiai és kémiai plaszticitását, továbbá szabályozhatják a portális erek átmérőjét a neuroszekréció helyén (14, 17). A jövőbeli vizsgálatok egyik további iránya a VGLUT2 termelés szabályozottsága (10, 11) lesz. Az endogén glutamát jelentőségének megértéséhez a laboratóriumunkban előállított GnRH sejtípus-függő VGLUT2-génkiütött állatmodell nyújthat segítséget, melynek jellemzését megkezdtük.



**III. Ábra. Aminosav transzmitterek neuroszekretoros idegsejtekben**

#### IV/4. 17 $\beta$ -ösztradiol kötését követő transzkripciós válaszok azonosítása a frontális agykéregben

A frontális agykéreg, mint ösztrogén célszerv teljes transzkriptomra kiterjedő microarray vizsgálatával az E2 által kiváltott génexpressziós válaszokat tanulmányoztuk. Először az egyszeri E2 injekció hatásait elemeztük ovariectomizált fiatal nőtény patkányokban (19). A humán menopauzát több szempontból is jobban közelítő állatmodellként, ezután bevezettük a középkorú ovariectomizált patkányok használatát. A kísérletben a krónikus hormonpótlási terápiát modellező, négyhetes infúziós E2 kezelés genomikus hatásait azonosítottuk (22).

Immuncitokémiai eredményeink szerint, mindkét nukleáris ösztrogén receptor altípus kimutatható a prefrontális agykéreg III-V. rétegeiben (19/1. ábra), jelezve, hogy az ösztrogének részben direkt módon hatnak a terület funkcióira.

Fiatal, ovariectomizált nőtény patkányok egyszeri E2 kezelését 24 órával követően, microarray vizsgálatainkban a frontális kérgi szövetblokk 136 génje mutatott a vivőanyaggal megkezelt állatokétól eltérő expressziót (szűrési feltételek:  $P < 0,05$ ; fold-change  $> 1,5$ ). 46 transzkriptum mennyisége nőtt a kezelés hatására. A megváltozott expressziójú gének közt (19/1. és 2. táblázatok) több neuropeptidet kódoló is előfordult (neurotenzin, cocaine- and amphetamine-regulated transcript, preproenkephalin). Az expressziós különbségeket válogatott esetekben RT-qPCR-rel is megerősítettük (19/3. táblázat). Több génválasz érintette a dopaminerg jelátvitelt (dopamin 1a receptor; adenosin A<sub>2A</sub> receptor, „Regulator of G-protein signaling-9”), valamint a Ca<sup>++</sup> szignalizáció elemeit (19/3. ábra). A változó gének közül a cocaine- and amphetamine-regulated transcript kérgi megoszlását *in situ* hibridizációval is megvizsgáltuk. A legintenzívebb hibridizációs jel a szomatoszenzoros kéreg IV. rétegében volt látható (19/3. ábra).

Az ovariectomizált, középkorú nőtény patkánymodell bevezetésével a tartósan alacsony ösztrogén szintnek kitett posztmenopauzális agy állapotát kívántuk pontosabban modellezni. A pótlásra használt E2 4-hetes *ip.* infúziója egyúttal a krónikus hormon pótlási terápia pontosabb modellezését is szolgálta. A krónikus kezelésre változást mutató transzkriptumok között ismét megjelentek neuropeptideket kódolók (neurotenzin, cocaine- and amphetamine-regulated transcript), valamint a dopaminerg jelátvitel molekuláris elemei (dopamin 1a és dopamin 2 receptorok, adenosin A<sub>2A</sub> receptor, „Regulator of G-protein signaling-9”; 22/2. táblázat). Szembetűnő expressziós változást mutatott számos immunválasszal összefüggő gén, köztük a klasszikus komplement aktiválódási út egyes komponenseit (C3 and C4b), Fc receptorokat (Fcgr2a és Fcgr2b), és MHC class I és class II antigéneket kódolók (22/2. táblázat).

#### Megbeszélés

A menopauzát követő E2 szint csökkenés agykérgi és limbikus funkciók zavarához vezet (Keenan *et al.*, 2001; Adams & Morrison, 2003; Genazzani *et al.*, 2005; Morrison *et al.*, 2006). Számos kognitív, emocionális, figyelmi, motivációs és tanulási folyamat hanyatlását azon genomikus változások okozzák, melyek az agyszövet ösztrogén hiányos állapotában jelentkeznek. A fiatal, ovariectomizált nőtény patkányok egyszeri E2 kezelését használó génexpressziós tanulmányunk a frontális agykéreg E2-függő génjeit azonosította. A vizsgálat általában kismérvű, de igen nagyszámú ösztrogén-függő génválaszt mutatott ki (19). A microarray módszerrel azonosított transzkriptumok finomabb molekuláris és neuroanatómiai vizsgálata laboratóriumunkban folyamatban van.

A posztmenopauzális E2-hiányos agyi állapot pontosabb modellezésére a középkorú ovariectomizált patkánymodellt használtuk, melyben a 4-hetes *sc.* E2 infúzió transzkriptomra gyakorolt hatásait elemeztük. Remélhető, hogy a vizsgálatban azonosított génválaszok közelebb visznek az ösztrogén-hiányos agyi állapottal társuló funkciózavarok jobb megértéséhez, elősegítik egyes kóros állapotokat jelző biomarkerek azonosítását valamint

sikeres hormonpótlási stratégiák (Bohacek & Daniel, Sherwin, 2003) kidolgozását. Rágcsálókban az agykéregre gyakorolt genomiális hatásokért a domináns ER- $\beta$  magreceptor típus lehet a felelős (Shughrue *et al.*, 1996; Shughrue *et al.*, 1997), felvetve annak lehetőségét, hogy a jótékony kérgi ösztrogén hatások ER- $\beta$  szelektív agonista ligandumokkal is kiválthatóak. Távolatilag ilyen ER- $\beta$  szelektív szerek használata hormonpótlásra kiküszöbölheti az ösztrogének - ER- $\alpha$  receptor által közvetített - proliferatív hatásait a méh és az emlő szöveteire, mely a hagyományos hormonpótlási stratégiák elterjedésének gátja (Nelson *et al.*, 2002; Beral, 2003).

## V. ÖSSZEFOGLALÁS

Legfontosabb eredményeink összefoglalva:

### A GnRH neuronok afferens szabályozására vonatkozóan, a következő új észleleteket tettük:

- Leírtuk ösztrogén receptor- $\alpha$  jelenlétét a tuberoinfundibuláris magkomplexum hisztaminerg sejtszoportjaiban patkányban. Patkány és ember GnRH neuronjainak sejtestjén és dendritjein hisztaminerg idegvégződéseket azonosítottunk. Megmutattuk, hogy patkányban H1 receptor antagonistával kivédhető az exogén ösztrogén adással kiváltott LH surge. A vizsgálatsorozattal igazoltuk a centrális hisztaminerg rendszer részvételét a pozitív ösztrogén visszacsatolás mechanizmusában.
- Patkány GnRH idegsejtjein kolinerg idegvégződéseket mutattunk ki, melyek a nem-szinaptikus jelátvitelre jellemző, szinaptikus specializáció nélküli direkt kontaktusokat képeztek.
- Megállapítottuk, hogy a GnRH idegsejtek NPY tartalmú afferenseinek fele a nucleus arcuatusból származik, AGRP neuropeptidet tartalmaz, és GABAerg jelátvitelre utaló szimmetrikus szinapszist képez GnRH idegsejtekkel. A kontaktusokat létrehozó NPY tartamú rostok egynegyede az agytörzsi katekolaminerg rendszerekből származik és a noradrenerg rendszer marker enzimjét hordozza.
- Leírtuk a humán hipotalamusz kisszeptin neuronrendszerét, annak jelentős nemi dimorfizmusát, neurokinin B tartalmát és GnRH idegsejtekkel alkotott axo-szomatikus, axo-dendritikus és axo-axonális kapcsolatait. Azonosítottunk egy szexuálisan dimorf kisszeptin sejtszoportot, mely csupán női hipotalamusz mintákban volt jelen, és elhelyezkedésében a rágcsálók - pozitív ösztrogén visszacsatolásában résztvevő - „RP3V”-beli kisszeptin sejtszoportjával analóg.
- Morfológiai és elektrofiziológiai megközelítésekkel feltártunk egy GABAerg afferenseket gátló, retrográd endokannabinoid szignalizációs mechanizmust, mely szerepet játszik a GnRH idegsejt aktivitás fiziológiás gátló szabályozásában.

### A “ $\beta$ ” típusú ösztrogén receptor szerepét vizsgáló tanulmányok fontosabb új eredményei az alábbiak:

- Új *in situ* hibridizációs eljárást dolgoztunk ki, mely alkalmas alacsony kópiaszámú mRNS-ek igen érzékeny hisztokémiai kimutatására.
- ER- $\beta$  mRNS, ösztrogén receptor ligandum kötés és nukleáris ER- $\beta$  immunreaktivitás kimutatásával bizonyítottuk egy GnRH neuronokat direkt módon is befolyásolni képes ösztrogén visszacsatolási út létezését.
- Immuncitokémiai bizonyítékot szolgáltatunk az ER- $\beta$  által közvetített, direkt ösztrogén visszacsatolás létezésére emberben.
- A GnRH-t termelő GT1-7 sejtvonalon microarray módszerrel számos 17 $\beta$ -ösztradiol által szabályozott gént és szignalizációs útvonalat azonosítottunk.



- Részletes anatómiai leírást adtunk az ER- $\beta$ -t tartalmazó hipotalamikusan oxitocin és vazopresszin idegsejt populációkról patkányban. Kimutattuk az ER- $\beta$  jelenlétét a humán hipotalamusz magnocelluláris neuronjaiban is.

#### **Új típusú glutamáterg mechanizmusok tanulmányozása az alábbi ismereteket hozta:**

- Megállapítottuk, hogy a hipotalamusz glutamáterg (VGLUT2 fenotípusú) neuronjainak egy csoportja az eminentia mediana és a neurohipofízis vér-agy gát-mentes területeire vetít. Ilyen neuroendokrin glutamáterg idegsejtek főképp a PVN, az SON, a nucleus periventricularis, az OVLT és az MPOA területén találhatók.
- Kettős-*in situ* hibridizáció és immuncitokémia használatával kimutattuk GnRH idegsejtekben a glutamáterg fenotípust bizonyító VGLUT2 jelenlétét.
- Leírtuk, hogy a GnRH idegsejtekéhez hasonló glutamáterg (VGLUT2) fenotípus jellemzi a hipofiziotrop TRH, CRH és szomatosztatin rendszereket, továbbá a magnocelluláris oxitocin és vazopresszin neuronokat is, míg a nucleus arcuatus GHRH idegsejtjei GABAergek.
- Kimutattuk, hogy az endokrin tengelyekre ható, nem-szinaptikus mechanizmusú glutamáterg hatások egy további helye az adenohipofízis, ahol a gonadotrop és tiotrop sejtek VGLUT2-t, míg a kortikotrop sejtek egy része VGLUT1-t tartalmaz.
- Igazoltuk, hogy a neuroszekretoros/szekretoros sejtek VGLUT2 expressziója több endokrin modellben is regulált. Sóterhelés a nucleus supraopticus vazopresszin neuronjaiban, míg a hypothyreoid állapot vagy a magas ösztrogén szint az adenohipofízisben fokozza a VGLUT2 mRNS expresszióját.

#### **Az agykérgi ösztrogén szignalizáció élettanának és menopauzában jelentkező zavarainak megértését célzó microarray vizsgálataink eredményei a következők:**

- Egyszeri E2 injekció frontális agykérgi transzkriptomra gyakorolt hatását ovariectomizált fiatal nőstény patkánymodellben vizsgálva, azonosítottunk számos ösztrogén-függő gént és jelátviteli utat. Kimutattuk több neuropeptidet kódoló, a dopaminerg jelátvitellel, valamint a kalcium szignalizációval összefüggő gén megváltozott expresszióját. A változások egy részét RT-qPCR módszerrel is megerősítettük.
- A humán menopauza rágcsló modelljeként középkorú ovariectomizált patkányokat használtunk. A krónikus hormonpótlási terápiát négyhetes, sc. E2 infúzióval modelleztük. Megmutattuk, hogy a krónikus E2 kezelés hatására tartósan megváltozik több dopaminerg jelátvitellel összefüggő, immunrendszerrel kapcsolatos, és neuropeptidet kódoló gén expressziója.

## **VI. IRODALOM**

### **VI/1 AZ ÉRTEKEZÉS ÁLTALÁNOS IRODALOMJEGYZÉKE**

- Abraham, I.M., Han, S.K., Todman, M.G., Korach, K.S. & Herbison, A.E. (2003) Estrogen receptor beta mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons in vivo. *J Neurosci*, **23**, 5771-5777.
- Acosta, J.I., Mayer, L.P., Braden, B.B., Nonnenmacher, S., Mennenga, S.E. & Bimonte-Nelson, H.A. (2010) The cognitive effects of conjugated equine estrogens depend on whether menopause etiology is transitional or surgical. *Endocrinology*, **151**, 3795-3804.
- Adams, M.M. & Morrison, J.H. (2003) Estrogen and the aging hippocampal synapse. *Cereb Cortex*, **13**, 1271-1275.
- Adams, T.E., Norman, R.L. & Spies, H.G. (1981) Gonadotropin-releasing hormone receptor binding and pituitary responsiveness in estradiol-primed monkeys. *Science*, **213**, 1388-1390.
- Aiyer, M.S., Fink, G. & Greig, F. (1974) Changes in the sensitivity of the pituitary gland to luteinizing hormone releasing factor during the oestrous cycle of the rat. *J Endocrinol*, **60**, 47-64.

- Arias, P., Jarry, H., Leonhardt, S., Moguilevsky, J.A. & Wuttke, W. (1993) Estradiol modulates the LH release response to N-methyl-D-aspartate in adult female rats: studies on hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone and neurotransmitter release. *Neuroendocrinology*, **57**, 710-715.
- Asch, R.H., Smith, C.G., Siler-Khodr, T.M. & Pauerstein, C.J. (1981) Effects of delta 9-tetrahydrocannabinol during the follicular phase of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Clin Endocrinol Metab*, **52**, 50-55.
- Ayalon, D., Nir, I., Cordova, T., Bauminger, S., Puder, M., Naor, Z., Kashi, R., Zor, U., Harell, A. & Lindner, H.R. (1977) Acute effect of delta1-tetrahydrocannabinol on the hypothalamo-pituitary-ovarian axis in the rat. *Neuroendocrinology*, **23**, 31-42.
- Baskin, D.G., Breininger, J.F. & Schwartz, M.W. (1999) Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes*, **48**, 828-833.
- Bauer-Dantoin, A.C., Urban, J.H. & Levine, J.E. (1992) Neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus is increased during preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology*, **131**, 2953-2958.
- Belchetz, P.E., Plant, T.M., Nakai, Y., Keogh, E.J. & Knobil, E. (1978) Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophyseal gonadotropin-releasing hormone. *Science*, **202**, 631-633.
- Benedetti, W.L., Lozdziesky, R., Sala, M.A., Monti, J.M. & Grino, E. (1969) Blockade of ovulation after atropine implants in the lateral hypothalamus of the rat. *Experientia*, **25**, 1158-1159.
- Beral, V. (2003) Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, **362**, 419-427.
- Berga, S.L. & Loucks, T.L. (2005) The diagnosis and treatment of stress-induced anovulation. *Minerva Ginecol*, **57**, 45-54.
- Bhat, G.K., Mahesh, V.B., Chu, Z.W., Chorch, L.P., Zamorano, P.L. & Brann, D.W. (1995) Localization of the N-methyl-D-aspartate R1 receptor subunit in specific anterior pituitary hormone cell types of the female rat. *Neuroendocrinology*, **62**, 178-186.
- Bhat, G.K., Mahesh, V.B., Ping, L., Chorch, L., Wiedmeier, V.T. & Brann, D.W. (1998) Opioid-glutamate-nitric oxide connection in the regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, **139**, 955-960.
- Bohacek, J. & Daniel, J.M. The beneficial effects of estradiol on attentional processes are dependent on timing of treatment initiation following ovariectomy in middle-aged rats. *Psychoneuroendocrinology*, **35**, 694-705.
- Bourguignon, J.P., Gerard, A., Mathieu, J., Simons, J. & Franchimont, P. (1989) Pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone from hypothalamic explants is restrained by blockade of N-methyl-D,L-aspartate receptors. *Endocrinology*, **125**, 1090-1096.
- Brann, D.W. (1995) Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology*, **61**, 213-225.
- Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M. & Hokfelt, T. (1998) The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15043-15048.
- Burger, L.L., Dalkin, A.C., Aylor, K.W., Haisenleder, D.J. & Marshall, J.C. (2002) GnRH pulse frequency modulation of gonadotropin subunit gene transcription in normal gonadotropes-assessment by primary transcript assay provides evidence for roles of GnRH and follistatin. *Endocrinology*, **143**, 3243-3249.
- Campbell, R.E., French-Mullen, J.M., Cowley, M.A., Smith, M.S. & Grove, K.L. (2001) Hypothalamic circuitry of neuropeptide Y regulation of neuroendocrine function and food intake via the Y5 receptor subtype. *Neuroendocrinology*, **74**, 106-119.
- Catt, K.J., Loumaye, E., Wynn, P.C., Iwashita, M., Hirota, K., Morgan, R.O. & Chang, J.P. (1985) GnRH receptors and actions in the control of reproductive function. *J Steroid Biochem*, **23**, 677-689.
- Christian, C.A., Glidewell-Kenney, C., Jameson, J.L. & Moenter, S.M. (2008) Classical estrogen receptor alpha signaling mediates negative and positive feedback on gonadotropin-releasing hormone neuron firing. *Endocrinology*, **149**, 5328-5334.

- Christian, C.A., Mobley, J.L. & Moenter, S.M. (2005) Diurnal and estradiol-dependent changes in gonadotropin-releasing hormone neuron firing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 15682-15687.
- Christian, C.A., Pielecka-Fortuna, J. & Moenter, S.M. (2009) Estradiol suppresses glutamatergic transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons in a model of negative feedback in mice. *Biol Reprod*, **80**, 1128-1135.
- Chronwall, B.M., DiMaggio, D.A., Massari, V.J., Pickel, V.M., Ruggiero, D.A. & O'Donohue, T.L. (1985) The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience*, **15**, 1159-1181.
- Ciofi, P., Leroy, D. & Tramu, G. (2006) Sexual dimorphism in the organization of the rat hypothalamic infundibular area. *Neuroscience*, **141**, 1731-1745.
- Clarkson, J. & Herbison, A.E. (2006) Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, **147**, 5817-5825.
- Clifton, D.K. & Sawyer, C.H. (1979) LH release and ovulation in the rat following depletion of hypothalamic norepinephrine: chronic vs. acute effects. *Neuroendocrinology*, **28**, 442-449.
- Coen, C.W. & Coombs, M.C. (1983) Effects of manipulating catecholamines on the incidence of the preovulatory surge of luteinizing hormone and ovulation in the rat: evidence for a necessary involvement of hypothalamic adrenaline in the normal or 'midnight' surge. *Neuroscience*, **10**, 187-206.
- Counis, R., Laverriere, J.N., Garrel, G., Bleux, C., Cohen-Tannoudji, J., Lerrant, Y., Kottler, M.L. & Magre, S. (2005) Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. *Reproduction, nutrition, development*, **45**, 243-254.
- Dalkin, A.C., Haisenleder, D.J., Ortolano, G.A., Ellis, T.R. & Marshall, J.C. (1989) The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*, **125**, 917-924.
- Dalterio, S., Steger, R., Peluso, J. & de Paolo, L. (1987) Acute delta 9-tetrahydrocannabinol exposure: effects on hypothalamic-pituitary-testicular activity in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, **26**, 533-537.
- De Cree, C. (1998) Sex steroid metabolism and menstrual irregularities in the exercising female. A review. *Sports Med*, **25**, 369-406.
- de Roux, N., Genin, E., Carel, J.C., Matsuda, F., Chaussain, J.L. & Milgrom, E. (2003) Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 10972-10976.
- DeFazio, R.A., Heger, S., Ojeda, S.R. & Moenter, S.M. (2002) Activation of A-type gamma-aminobutyric acid receptors excites gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol*, **16**, 2872-2891.
- DeFazio, R.A. & Moenter, S.M. (2002) Estradiol feedback alters potassium currents and firing properties of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol*, **16**, 2255-2265.
- Degroot, A., Kofalvi, A., Wade, M.R., Davis, R.J., Rodrigues, R.J., Rebola, N., Cunha, R.A. & Nomikos, G.G. (2006) CB1 receptor antagonism increases hippocampal acetylcholine release: site and mechanism of action. *Mol Pharmacol*, **70**, 1236-1245.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. & Mechoulam, R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, **258**, 1946-1949.
- Diano, S., Naftolin, F. & Horvath, T.L. (1998) Kainate glutamate receptors (GluR5-7) in the rat arcuate nucleus: relationship to tanycytes, astrocytes, neurons and gonadal steroid receptors. *J Neuroendocrinol*, **10**, 239-247.
- Dumalska, I., Wu, M., Morozova, E., Liu, R., van den Pol, A. & Alreja, M. (2008) Excitatory effects of the puberty-initiating peptide kisspeptin and group I metabotropic glutamate receptor agonists differentiate two distinct subpopulations of gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci*, **28**, 8003-8013.
- Erickson, J.C., Hollopeter, G. & Palmiter, R.D. (1996) Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science*, **274**, 1704-1707.

- Erickson, J.D., De Gois, S., Varoqui, H., Schafer, M.K. & Weihe, E. (2006) Activity-dependent regulation of vesicular glutamate and GABA transporters: a means to scale quantal size. *Neurochem Int*, **48**, 643-649.
- Everett, J.W. (1964) Central Neural Control of Reproductive Functions of the Adenohypophysis. *Physiol Rev*, **44**, 373-431.
- Everitt, B.J., Hokfelt, T., Terenius, L., Tatemoto, K., Mutt, V. & Goldstein, M. (1984) Differential co-existence of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity with catecholamines in the central nervous system of the rat. *Neuroscience*, **11**, 443-462.
- Eyigor, O. & Jennes, L. (1998) Identification of kainate-preferring glutamate receptor subunit GluR7 mRNA and protein in the rat median eminence. *Brain Res*, **814**, 231-235.
- Eyigor, O. & Jennes, L. (2000) Kainate receptor subunit-positive gonadotropin-releasing hormone neurons express c-Fos during the steroid-induced luteinizing hormone surge in the female rat. *Endocrinology*, **141**, 779-786.
- Franceschini, I., Lomet, D., Cateau, M., Delsol, G., Tillet, Y. & Caraty, A. (2006) Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett*, **401**, 225-230.
- Fukudome, Y., Ohno-Shosaku, T., Matsui, M., Omori, Y., Fukaya, M., Tsubokawa, H., Taketo, M.M., Watanabe, M., Manabe, T. & Kano, M. (2004) Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling. *The European Journal of Neuroscience*, **19**, 2682-2692.
- Genazzani, A.R., Bernardi, F., Pluchino, N., Begliuomini, S., Lenzi, E., Casarosa, E. & Luisi, M. (2005) Endocrinology of menopausal transition and its brain implications. *CNS Spectr*, **10**, 449-457.
- Gerdeman, G. & Lovinger, D.M. (2001) CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol*, **85**, 468-471.
- Gillard, S.E., Tzaferis, J., Tsui, H.C. & Kingston, A.E. (2003) Expression of metabotropic glutamate receptors in rat meningeal and brain microvasculature and choroid plexus. *J Comp Neurol*, **461**, 317-332.
- Goodman, R.L., Lehman, M.N., Smith, J.T., Coolen, L.M., de Oliveira, C.V., Jafarzadehshirazi, M.R., Pereira, A., Iqbal, J., Caraty, A., Ciofi, P. & Clarke, I.J. (2007) Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology*, **148**, 5752-5760.
- Gottsch, M.L., Cunningham, M.J., Smith, J.T., Popa, S.M., Acohido, B.V., Crowley, W.F., Seminara, S., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (2004) A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, **145**, 4073-4077.
- Guran, T., Tolhurst, G., Bereket, A., Rocha, N., Porter, K., Turan, S., Gribble, F.M., Kotan, L.D., Akcay, T., Atay, Z., Canan, H., Serin, A., O'Rahilly, S., Reimann, F., Semple, R.K. & Topaloglu, A.K. (2009) Hypogonadotropic hypogonadism due to a novel missense mutation in the first extracellular loop of the neurokinin B receptor. *J Clin Endocrinol Metab*, **94**, 3633-3639.
- Han, S.K., Gottsch, M.L., Lee, K.J., Popa, S.M., Smith, J.T., Jakawich, S.K., Clifton, D.K., Steiner, R.A. & Herbison, A.E. (2005) Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci*, **25**, 11349-11356.
- Hayashi, M., Yamada, H., Uehara, S., Morimoto, R., Muroyama, A., Yatsushiro, S., Takeda, J., Yamamoto, A. & Moriyama, Y. (2003) Secretory granule-mediated co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islets of Langerhans. *J Biol Chem*, **278**, 1966-1974.
- Herbison, A.E. (1998) Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev*, **19**, 302-330.
- Herbison, A.E. (2008) Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Res Rev*, **57**, 277-287.
- Herbison, A.E. & Theodosis, D.T. (1992) Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. *Neuroscience*, **50**, 283-298.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., de Costa, B.R. & Richfield, E.K. (1991) Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res*, **547**, 267-274.

- Herzog, E., Bellenchi, G.C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., Gasnier, B., Giros, B. & El Mestikawy, S. (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci*, **21**, RC181.
- Hoffman, A.F. & Lupica, C.R. (2000) Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurosci*, **20**, 2470-2479.
- Hokfelt, T., Broberger, C., Xu, Z.Q., Sergeev, V., Ubink, R. & Diez, M. (2000) Neuropeptides--an overview. *Neuropharmacology*, **39**, 1337-1356.
- Hokfelt, T., Elfvin, L.G., Elde, R., Schultzberg, M., Goldstein, M. & Luft, R. (1977) Occurrence of somatostatin-like immunoreactivity in some peripheral sympathetic noradrenergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 3587-3591.
- Hrabovszky, E., Kallo, I., Hajszan, T., Shughrue, P.J., Merchenthaler, I. & Liposits, Z. (1998) Expression of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid in oxytocin and vasopressin neurons of the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *Endocrinology*, **139**, 2600-2604.
- Irwig, M.S., Fraley, G.S., Smith, J.T., Acohido, B.V., Popa, S.M., Cunningham, M.J., Gottsch, M.L., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (2004) Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, **80**, 264-272.
- Jarry, H., Leonhardt, S., Schwarze, T. & Wuttke, W. (1995) Preoptic rather than mediobasal hypothalamic amino acid neurotransmitter release regulates GnRH secretion during the estrogen-induced LH surge in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology*, **62**, 479-486.
- Jennes, L., Jennes, M.E., Purvis, C. & Nees, M. (1992) c-fos expression in noradrenergic A2 neurons of the rat during the estrous cycle and after steroid hormone treatments. *Brain Res*, **586**, 171-175.
- Jirikowski, G.F., Caldwell, J.D., Pedersen, C.A. & Stumpf, W.E. (1988) Estradiol influences oxytocin-immunoreactive brain systems. *Neuroscience*, **25**, 237-248.
- Kalra, S.P. & Crowley, W.R. (1992) Neuropeptide Y: a novel neuroendocrine peptide in the control of pituitary hormone secretion, and its relation to luteinizing hormone. *Front Neuroendocrinol*, **13**, 1-46.
- Karsch, F.J. & Foster, D.L. (1975) Sexual differentiation of the mechanism controlling the preovulatory discharge of luteinizing hormone in sheep. *Endocrinology*, **97**, 373-379.
- Katona, I., Rancz, E.A., Acsady, L., Ledent, C., Mackie, K., Hajos, N. & Freund, T.F. (2001) Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J Neurosci*, **21**, 9506-9518.
- Katona, I., Sperlagh, B., Sik, A., Kafalvi, A., Vizi, E.S., Mackie, K. & Freund, T.F. (1999) Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci*, **19**, 4544-4558.
- Kauffman, A.S., Gottsch, M.L., Roa, J., Byquist, A.C., Crown, A., Clifton, D.K., Hoffman, G.E., Steiner, R.A. & Tena-Sempere, M. (2007) Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology*, **148**, 1774-1783.
- Kawakami, S. (2000) Glial and neuronal localization of ionotropic glutamate receptor subunit-immunoreactivities in the median eminence of female rats: GluR2/3 and GluR6/7 colocalize with vimentin, not with glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Brain Res*, **858**, 198-204.
- Kawakami, S., Ichikawa, M., Murahashi, K., Hirunagi, K., Tsukamura, H. & Maeda, K. (1998a) Excitatory amino acids act on the median eminence nerve terminals to induce gonadotropin-releasing hormone release in female rats. *Gen Comp Endocrinol*, **112**, 372-382.
- Kawakami, S.I., Hirunagi, K., Ichikawa, M., Tsukamura, H. & Maeda, K.I. (1998b) Evidence for terminal regulation of GnRH release by excitatory amino acids in the median eminence in female rats: a dual immunoelectron microscopic study. *Endocrinology*, **139**, 1458-1461.
- Keenan, P.A., Ezzat, W.H., Ginsburg, K. & Moore, G.J. (2001) Prefrontal cortex as the site of estrogen's effect on cognition. *Psychoneuroendocrinology*, **26**, 577-590.
- Kinoshita, M., Tsukamura, H., Adachi, S., Matsui, H., Uenoyama, Y., Iwata, K., Yamada, S., Inoue, K., Ohtaki, T., Matsumoto, H. & Maeda, K. (2005) Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology*, **146**, 4431-4436.
- Kiss, J., Kocsis, K., Csaki, A. & Halasz, B. (2003) Evidence for vesicular glutamate transporter synapses onto gonadotropin-releasing hormone and other neurons in the rat medial preoptic area. *Eur J Neurosci*, **18**, 3267-3278.

- Kiyama, H., Sato, K. & Tohyama, M. (1993) Characteristic localization of non-NMDA type glutamate receptor subunits in the rat pituitary gland. *Brain Res Mol Brain Res*, **19**, 262-268.
- Knobil, E. (1980) The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent progress in hormone research*, **36**, 53-88.
- Knobil, E. (1990) The GnRH pulse generator. *Am J Obstet Gynecol*, **163**, 1721-1727.
- Korach, K.S., Couse, J.F., Curtis, S.W., Washburn, T.F., Lindzey, J., Kimbro, K.S., Eddy, E.M., Migliaccio, S., Snedeker, S.M., Lubahn, D.B., Schomberg, D.W. & Smith, E.P. (1996) Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes. *Recent progress in hormone research*, **51**, 159-186; discussion 186-158.
- Koutras, D.A. (1997) Disturbances of menstruation in thyroid disease. *Ann N Y Acad Sci*, **816**, 280-284.
- Krajewski, S.J., Anderson, M.J., Iles-Shih, L., Chen, K.J., Urbanski, H.F. & Rance, N.E. (2005) Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. *J Comp Neurol*, **489**, 372-386.
- Krizbai, I.A., Deli, M.A., Pestenacz, A., Siklos, L., Szabo, C.A., Andras, I. & Joo, F. (1998) Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res*, **54**, 814-819.
- Krsmanovic, L.Z., Hu, L., Leung, P.K., Feng, H. & Catt, K.J. Pulsatile GnRH secretion: roles of G protein-coupled receptors, second messengers and ion channels. *Mol Cell Endocrinol*, **314**, 158-163.
- Krsmanovic, L.Z., Stojilkovic, S.S. & Catt, K.J. (1996) Pulsatile gonadotropin-releasing hormone release and its regulation. *Trends Endocrinol Metab*, **7**, 56-59.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J.A. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5925-5930.
- Laflamme, N., Nappi, R.E., Drolet, G., Labrie, C. & Rivest, S. (1998) Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J Neurobiol*, **36**, 357-378.
- Lehman, M.N. & Karsch, F.J. (1993) Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase-, and beta-endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in the Suffolk ewe. *Endocrinology*, **133**, 887-895.
- Lehman, M.N. & Silverman, A.J. (1988) Ultrastructure of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons and their projections in the golden hamster. *Brain Res Bull*, **20**, 211-221.
- Leranth, C., MacLusky, N.J., Sakamoto, H., Shanabrough, M. & Naftolin, F. (1985) Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on LHRH neurons in the rat medial preoptic area. *Neuroendocrinology*, **40**, 536-539.
- Li, C., Chen, P. & Smith, M.S. (1999) Morphological evidence for direct interaction between arcuate nucleus neuropeptide Y (NPY) neurons and gonadotropin-releasing hormone neurons and the possible involvement of NPY Y1 receptors. *Endocrinology*, **140**, 5382-5390.
- Limonta, P., Montagnani Marelli, M. & Moretti, R.M. (2001) LHRH analogues as anticancer agents: pituitary and extrapituitary sites of action. *Expert Opin Investig Drugs*, **10**, 709-720.
- Lin, W., McKinney, K., Liu, L., Lakhlani, S. & Jennes, L. (2003) Distribution of vesicular glutamate transporter-2 messenger ribonucleic Acid and protein in the septum-hypothalamus of the rat. *Endocrinology*, **144**, 662-670.
- Liposits, Z., Merchenthaler, I., Wetsel, W.C., Reid, J.J., Mellon, P.L., Weiner, R.I. & Negro-Vilar, A. (1991) Morphological characterization of immortalized hypothalamic neurons synthesizing luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology*, **129**, 1575-1583.
- Liposits, Z. & Setalo, G. (1980) Descending luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) nerve fibers to the midbrain of the rat. *Neurosci Lett*, **20**, 1-4.
- Liposits, Z., Setalo, G. & Flerko, B. (1984) Application of the silver-gold intensified 3,3'-diaminobenzidine chromogen to the light and electron microscopic detection of the luteinizing hormone-releasing hormone system of the rat brain. *Neuroscience*, **13**, 513-525.
- Livshits, A. & Seidman, D.S. (2009) Fertility issues in women with diabetes. *Womens Health (Lond Engl)*, **5**, 701-707.
- Marshall, J.C. & Griffin, M.L. (1993) The role of changing pulse frequency in the regulation of ovulation. *Hum Reprod*, **8 Suppl 2**, 57-61.

- Matagne, V., Lebrethon, M.C., Gerard, A. & Bourguignon, J.P. (2005) Kainate/estrogen receptor involvement in rapid estradiol effects in vitro and intracellular signaling pathways. *Endocrinology*, **146**, 2313-2323.
- Matesic, D.F., Germak, J.A., Dupont, E. & Madhukar, B.V. (1993) Immortalized hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone neurons express a connexin 26-like protein and display functional gap junction coupling assayed by fluorescence recovery after photobleaching. *Neuroendocrinology*, **58**, 485-492.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R. & et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, **50**, 83-90.
- Meister, B. & Hokfelt, T. (1988) Peptide- and transmitter-containing neurons in the mediobasal hypothalamus and their relation to GABAergic systems: possible roles in control of prolactin and growth hormone secretion. *Synapse*, **2**, 585-605.
- Meister, B., Hokfelt, T., Geffard, M. & Oertel, W. (1988) Glutamic acid decarboxylase- and gamma-aminobutyric acid-like immunoreactivities in corticotropin-releasing factor-containing parvocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*, **48**, 516-526.
- Mellon, P.L., Windle, J.J., Goldsmith, P.C., Padula, C.A., Roberts, J.L. & Weiner, R.I. (1990) Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron*, **5**, 1-10.
- Merchenthaler, I. (2005) Estrogen stimulates galanin expression within luteinizing hormone-releasing hormone-immunoreactive (LHRH-i) neurons via estrogen receptor-beta (ERbeta) in the female rat brain. *Neuropeptides*, **39**, 341-343.
- Merchenthaler, I., Culler, M.D., Petrusz, P., Flerko, B. & Negro-Vilar, A. (1989) Immunocytochemical localization of the gonadotropin-releasing hormone-associated peptide portion of the LHRH precursor in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the rat central nervous system. *Cell Tissue Res*, **255**, 5-14.
- Merchenthaler, I., Kovacs, G., Lavasz, G. & Setalo, G. (1980) The preoptico-infundibular LH-RH tract of the rat. *Brain Res*, **198**, 63-74.
- Miller, C.A. & Golden, N.H. An introduction to eating disorders: clinical presentation, epidemiology, and prognosis. *Nutr Clin Pract*, **25**, 110-115.
- Mitchner, N.A., Garlick, C. & Ben-Jonathan, N. (1998) Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland. *Endocrinology*, **139**, 3976-3983.
- Moenter, S.M., Caraty, A. & Karsch, F.J. (1990) The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology*, **127**, 1375-1384.
- Moenter, S.M., Chu, Z. & Christian, C.A. (2009) Neurobiological mechanisms underlying oestradiol negative and positive feedback regulation of gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol*, **21**, 327-333.
- Moenter, S.M., DeFazio, A.R., Pitts, G.R. & Nunemaker, C.S. (2003) Mechanisms underlying episodic gonadotropin-releasing hormone secretion. *Front Neuroendocrinol*, **24**, 79-93.
- Morrison, J.H., Brinton, R.D., Schmidt, P.J. & Gore, A.C. (2006) Estrogen, menopause, and the aging brain: how basic neuroscience can inform hormone therapy in women. *J Neurosci*, **26**, 10332-10348.
- Mounzih, K., Lu, R. & Chehab, F.F. (1997) Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology*, **138**, 1190-1193.
- Navarro, V.M., Gottsch, M.L., Chavkin, C., Okamura, H., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (2009) Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci*, **29**, 11859-11866.
- Negoro, H., Visessuwan, S. & Holland, R.C. (1973) Unit activity in the paraventricular nucleus of female rats at different stages of the reproductive cycle and after ovariectomy, with or without oestrogen or progesterone treatment. *J Endocrinol*, **59**, 545-558.
- Nelson, H.D., Humphrey, L.L., Nygren, P., Teutsch, S.M. & Allan, J.D. (2002) Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. *JAMA*, **288**, 872-881.
- Noris, G., Hol, D., Clapp, C. & Martinez de la Escalera, G. (1995) Histamine directly stimulates gonadotropin-releasing hormone secretion from GT1-1 cells via H1 receptors coupled to phosphoinositide hydrolysis. *Endocrinology*, **136**, 2967-2974.

- Oakley, A.E., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (2009) Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev*, **30**, 713-743.
- Ohtsuka, S., Nishizaki, T., Tasaka, K., Miyake, A., Tanizawa, O., Yamatodani, A. & Wada, H. (1989) Estrogen stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat hypothalamus independently through catecholamine and histamine in vitro. *Acta Endocrinol (Copenh)*, **120**, 644-648.
- Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., Lutz, B. & Pasquali, R. (2006) The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocrine reviews*, **27**, 73-100.
- Panula, P., Pirvola, U., Auvinen, S. & Airaksinen, M.S. (1989) Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience*, **28**, 585-610.
- Panula, P., Yang, H.Y. & Costa, E. (1984) Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 2572-2576.
- Pau, K.Y., Berria, M., Hess, D.L. & Spies, H.G. (1993) Preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in ovarian-intact rhesus macaques. *Endocrinology*, **133**, 1650-1656.
- Petersen, S. & McCrone, S. (1994) Characterization of the receptor complement of individual neurons using dual-label in situ hybridization histochemistry. In JH Eberwine, Valentino, K., Barchas, J. (eds) *In situ hybridization in neurobiology. Advances in methodology*. Oxford University Press, New York, pp. 78-94.
- Petersen, S.L., Ottem, E.N. & Carpenter, C.D. (2003) Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biol Reprod*, **69**, 1771-1778.
- Pielecka-Fortuna, J., Chu, Z. & Moenter, S.M. (2008) Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology*, **149**, 1979-1986.
- Ping, L., Mahesh, V.B., Bhat, G.K. & Brann, D.W. (1997) Regulation of gonadotropin-releasing hormone and luteinizing hormone secretion by AMPA receptors. Evidence for a physiological role of AMPA receptors in the steroid-induced luteinizing hormone surge. *Neuroendocrinology*, **66**, 246-253.
- Ping, L., Mahesh, V.B., Wiedmeier, V.T. & Brann, D.W. (1994) Release of glutamate and aspartate from the preoptic area during the progesterone-induced LH surge: in vivo microdialysis studies. *Neuroendocrinology*, **59**, 318-324.
- Prevot, V., Bouret, S., Stefano, G.B. & Beauvillain, J. (2000) Median eminence nitric oxide signaling. *Brain Res Brain Res Rev*, **34**, 27-41.
- Ramaswamy, S., Guerriero, K.A., Gibbs, R.B. & Plant, T.M. (2008) Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology*, **149**, 4387-4395.
- Rance, N.E., McMullen, N.T., Smialek, J.E., Price, D.L. & Young, W.S., 3rd (1990) Postmenopausal hypertrophy of neurons expressing the estrogen receptor gene in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab*, **71**, 79-85.
- Rance, N.E., Young, W.S., 3rd & McMullen, N.T. (1994) Topography of neurons expressing luteinizing hormone-releasing hormone gene transcripts in the human hypothalamus and basal forebrain. *J Comp Neurol*, **339**, 573-586.
- Revel, F.G., Masson-Pevet, M., Pevet, P., Mikkelsen, J.D. & Simonneaux, V. (2009) Melatonin controls seasonal breeding by a network of hypothalamic targets. *Neuroendocrinology*, **90**, 1-14.
- Richardson, S.B., Prasad, J.A. & Hollander, C.S. (1982) Acetylcholine, melatonin, and potassium depolarization stimulate release of luteinizing hormone-releasing hormone from rat hypothalamus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 2686-2689.
- Rometo, A.M., Krajewski, S.J., Voytko, M.L. & Rance, N.E. (2007) Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**, 2744-2750.
- Sarkar, D.K., Chiappa, S.A., Fink, G. & Sherwood, N.M. (1976) Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats. *Nature*, **264**, 461-463.
- Saunders, P.T., Millar, M.R., Williams, K., Macpherson, S., Harkiss, D., Anderson, R.A., Orr, B., Groome, N.P., Scobie, G. & Fraser, H.M. (2000) Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta and androgen receptor in the ovaries of marmosets and humans. *Biol Reprod*, **63**, 1098-1105.



- Sawchenko, P.E., Swanson, L.W., Grzanna, R., Howe, P.R., Bloom, S.R. & Polak, J.M. (1985) Colocalization of neuropeptide Y immunoreactivity in brainstem catecholaminergic neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol*, **241**, 138-153.
- Sawyer, C.H. (1955) Rhinencephalic involvement in pituitary activation by intraventricular histamine in the rabbit under nembutal anesthesia. *Am J Physiol*, **180**, 37-46.
- Schwanzel-Fukuda, M. & Pfaff, D.W. (1990) The migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons from the medial olfactory placode into the medial basal forebrain. *Experientia*, **46**, 956-962.
- Seminara, S.B., Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Jr., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwino, K.M., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U.B., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F., O'Rahilly, S., Carlton, M.B., Crowley, W.F., Jr., Aparicio, S.A. & Colledge, W.H. (2003) The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*, **349**, 1614-1627.
- Seminara, S.B., Oliveira, L.M., Beranova, M., Hayes, F.J. & Crowley, W.F., Jr. (2000) Genetics of hypogonadotropic hypogonadism. *J Endocrinol Invest*, **23**, 560-565.
- Semple, R.K., Achermann, J.C., Ellery, J., Farooqi, I.S., Karet, F.E., Stanhope, R.G., O'Rahilly, S. & Aparicio, S.A. (2005) Two novel missense mutations in g protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*, **90**, 1849-1855.
- Shahab, M., Mastronardi, C., Seminara, S.B., Crowley, W.F., Ojeda, S.R. & Plant, T.M. (2005) Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 2129-2134.
- Sherwin, B.B. (2003) Estrogen and cognitive functioning in women. *Endocr Rev*, **24**, 133-151.
- Shivers, B.D., Harlan, R.E., Morrell, J.I. & Pfaff, D.W. (1983) Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature*, **304**, 345-347.
- Shughrue, P.J., Komm, B. & Merchenthaler, I. (1996) The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in the rat hypothalamus. *Steroids*, **61**, 678-681.
- Shughrue, P.J., Lane, M.V. & Merchenthaler, I. (1997) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, **388**, 507-525.
- Shughrue, P.J. & Merchenthaler, I. (2001) Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, **436**, 64-81.
- Simerly, R.B., Chang, C., Muramatsu, M. & Swanson, L.W. (1990) Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*, **294**, 76-95.
- Simonovic, I., Motta, M. & Martini, L. (1974) Acetylcholine and the release of the follicle-stimulating hormone-releasing factor. *Endocrinology*, **95**, 1373-1379.
- Skowsky, W.R., Swan, L. & Smith, P. (1979) Effects of sex steroid hormones on arginine vasopressin in intact and castrated male and female rats. *Endocrinology*, **104**, 105-108.
- Smith, C.G., Smith, M.T., Besch, N.F., Smith, R.G. & Asch, R.H. (1978) Effect of delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) on female reproductive function. *Adv Biosci*, **22-23**, 449-467.
- Smith, J.T., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (2006) Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction (Cambridge, England)*, **131**, 623-630.
- Sullivan, S.D., DeFazio, R.A. & Moenter, S.M. (2003) Metabolic regulation of fertility through presynaptic and postsynaptic signaling to gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci*, **23**, 8578-8585.
- Teles, M.G., Bianco, S.D., Brito, V.N., Trarbach, E.B., Kuohung, W., Xu, S., Seminara, S.B., Mendonca, B.B., Kaiser, U.B. & Latronico, A.C. (2008) A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med*, **358**, 709-715.
- Temple, J.L., Laing, E., Sunder, A. & Wray, S. (2004) Direct action of estradiol on gonadotropin-releasing hormone-1 neuronal activity via a transcription-dependent mechanism. *J Neurosci*, **24**, 6326-6333.
- Terasawa, E. (1998) Cellular mechanism of pulsatile LHRH release. *Gen Comp Endocrinol*, **112**, 283-295.
- Tobet, S.A., Chickering, T.W., King, J.C., Stopa, E.G., Kim, K., Kuo-Leblank, V. & Schwarting, G.A. (1996) Expression of gamma-aminobutyric acid and gonadotropin-releasing hormone during neuronal migration through the olfactory system. *Endocrinology*, **137**, 5415-5420.

- Topaloglu, A.K., Reimann, F., Guclu, M., Yalin, A.S., Kotan, L.D., Porter, K.M., Serin, A., Mungan, N.O., Cook, J.R., Ozbek, M.N., Imamoglu, S., Akalin, N.S., Yuksel, B., O'Rahilly, S. & Semple, R.K. (2009) TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet*, **41**, 354-358.
- Tsuruo, Y., Kawano, H., Kagotani, Y., Hisano, S., Daikoku, S., Chihara, K., Zhang, T. & Yanaihara, N. (1990) Morphological evidence for neuronal regulation of luteinizing hormone-releasing hormone-containing neurons by neuropeptide Y in the rat septo-preoptic area. *Neurosci Lett*, **110**, 261-266.
- Urbanski, H.F. & Ojeda, S.R. (1987) Activation of luteinizing hormone-releasing hormone release advances the onset of female puberty. *Neuroendocrinology*, **46**, 273-276.
- van den Pol, A.N., Wuarin, J.P. & Dudek, F.E. (1990) Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Science*, **250**, 1276-1278.
- Van Tol, H.H., Bolwerk, E.L., Liu, B. & Burbach, J.P. (1988) Oxytocin and vasopressin gene expression in the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat during the estrous cycle, pregnancy, and lactation. *Endocrinology*, **122**, 945-951.
- Vida, B., Deli, L., Hrabovszky, E., Kalamatianos, T., Caraty, A., Coen, C.W., Liposits, Z. & Kalló, I. (2010) Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurons innervating kisspeptin neurons in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen. (2010) *J. Neuroendocrinol.* (In press).
- Vizi, E.S., Katona, I. & Freund, T.F. (2001) Evidence for presynaptic cannabinoid CB(1) receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the guinea pig lung. *Eur J Pharmacol*, **431**, 237-244.
- Vizi, E.S. & Kiss, J.P. (1998) Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus*, **8**, 566-607.
- Wang, H., Ward, A.R. & Morris, J.F. (1995) Oestradiol acutely stimulates exocytosis of oxytocin and vasopressin from dendrites and somata of hypothalamic magnocellular neurons. *Neuroscience*, **68**, 1179-1188.
- Wenger, T., Rettori, V., Snyder, G.D., Dalterio, S. & McCann, S.M. (1987) Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on the hypothalamic-pituitary control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in adult male rats. *Neuroendocrinology*, **46**, 488-493.
- Wetsel, W.C., Valenca, M.M., Merchenthaler, I., Liposits, Z., Lopez, F.J., Weiner, R.I., Mellon, P.L. & Negro-Vilar, A. (1992) Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone-secreting neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 4149-4153.
- Wildt, L., Hausler, A., Marshall, G., Hutchison, J.S., Plant, T.M., Belchetz, P.E. & Knobil, E. (1981) Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*, **109**, 376-385.
- Witkin, J.W. (1999) Synchronized neuronal networks: the GnRH system. *Microsc Res Tech*, **44**, 11-18.
- Witkin, J.W. & Silverman, A.J. (1985) Synaptology of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in rat preoptic area. *Peptides*, **6**, 263-271.
- Wojcik, S.M., Rhee, J.S., Herzog, E., Sigler, A., Jahn, R., Takamori, S., Brose, N. & Rosenmund, C. (2004) An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7158-7163.
- Wray, S., Grant, P. & Gainer, H. (1989) Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 8132-8136.
- Yin, W., Mendenhall, J.M., Bratton, S.B., Oung, T., Janssen, W.G., Morrison, J.H. & Gore, A.C. (2007) Novel localization of NMDA receptors within neuroendocrine gonadotropin-releasing hormone terminals. *Exp Biol Med (Maywood)*, **232**, 662-673.
- Zhang, C., Bosch, M.A., Ronnekleiv, O.K. & Kelly, M.J. (2009) Gamma-aminobutyric acid B receptor mediated inhibition of gonadotropin-releasing hormone neurons is suppressed by kisspeptin-G protein-coupled receptor 54 signaling. *Endocrinology*, **150**, 2388-2394.

## VI/2 AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

- (1) Fekete Cs., Strutton P.H., Cagampang F.R.A., **Hrabovszky E.**, Kalló I., Shughrue P.J., Dobó E., Mihály E., Baranyi L., Okada H., Panula P., Merchenthaler I., Coen C.W. and Liposits Zs. (1999): Estrogen receptor-immunoreactivity is present in the majority of central histaminergic neurons: evidence for a new neuroendocrine pathway associated with luteinizing hormone-releasing hormone-synthesising neurons in rats and humans. *Endocrinology*: 140:4335-4341
- (2) **Hrabovszky E.**, Shughrue P.J., Merchenthaler I., Hajszán T., Liposits Zs, Carpenter C.D. and Petersen S.L. (2000): Detection of estrogen receptor- $\beta$  messenger ribonucleic acid and  $^{125}\text{I}$  [estrogen] binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*: 141:3506-3509
- (3) **Hrabovszky E.**, Steinhauser A., Barabás K., Shughrue P.J., Petersen S.L., Merchenthaler I. and Liposits Zs. (2001): Estrogen receptor- $\beta$  immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*: 142:3261-3264
- (4) **Hrabovszky E.** and Petersen S.L. (2002): Increased concentrations of radioisotopically-labeled complementary ribonucleic acid probe, dextran sulfate and dithiothreitol in the hybridization buffer can improve results of *in situ* hybridization histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*: 50:1389-1400
- (5) Turi F.G., Liposits Zs., Moenter S.M., Fekete Cs. and **Hrabovszky E.** (2003): Origin of neuropeptide Y-containing afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons in male mice. *Endocrinology*: 144:4967-4974
- (6) **Hrabovszky E.**, Kalló I., Steinhauser A., Merchenthaler I., Coen C.W., Petersen S.L. and Liposits Zs (2004): Estrogen receptor- $\beta$  in oxytocin and vasopressin neurons of the rat and human hypothalamus. Immunocytochemical and *in situ* hybridization studies. *J. Comp. Neurol.*: 473: 315-333
- (7) **Hrabovszky E.**, Turi G.F., Kalló I. and Liposits Z. (2004): Expression of vesicular glutamate transporter-2 in gonadotropin-releasing hormone neurons of the adult male rat. *Endocrinology*: 145: 4018-4021
- (8) **Hrabovszky E.**, Wittmann G., Turi G.F. Liposits Z. and Fekete C. (2005): Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone neurons of the rat contain vesicular glutamate transporter-2. *Endocrinology*: 146: 341-347
- (9) **Hrabovszky E.**, Turi G.F. Liposits Z. (2005): Presence of vesicular glutamate transporter-2 in hypophysiotropic somatostatin but not growth hormone-releasing hormone neurons of the male rat. *Eur. J. Neurosci.*: 21(8): 2120-2126
- (10) **Hrabovszky E.**, Csapó Á.K., Kalló I., Wilhelm T., Turi G.F. and Liposits Zs. (2006): Localization and osmotic regulation of vesicular glutamate transporter-2 in magnocellular neurons of the rat hypothalamus. *Neurochem. Int.*: 48:753-761
- (11) **Hrabovszky E.**, Kalló I., Turi G.F., May K., Wittmann G., Fekete C. and Liposits Zs. (2006): Expression of vesicular glutamate transporter-2 in gonadotrope and thyrotrope cells of the rat pituitary. Regulation by estrogen and thyroid hormone status. *Endocrinology*: 147(8):3818-3825
- (12) **Hrabovszky E.**, Deli L., Turi G.F., Kalló I. and Liposits Zs. (2007): Glutamatergic innervation of the hypothalamic median eminence and posterior pituitary of the rat. *Neuroscience*: 144: 1383-1392
- (13) Wittmann G., Deli L., Kalló I., **Hrabovszky E.**, Watanabe M., Liposits Zs. and Fekete C. (2007): Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1) immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. *J. Comp. Neurol.*: 503: 270-279

- (14) **Hrabovszky E.** and Liposits Z. (2007) Glutamatergic phenotype of hypothalamic neurosecretory systems: a novel aspect of central neuroendocrine regulation. *Clinical Neuroscience/Ideggyógyászati Szemle*: 60: 177-181
- (15) **Hrabovszky E.**, Kalló I., Szlávik N., Keller É., Merchenthaler I. and Liposits Zs. (2007) Gonadotropin-releasing hormone neurons express estrogen receptor- $\beta$ . *J. Clin. Endocr. Metab.*: 92(7): 2827-2830
- (16) Turi G.F., Liposits Z. and **Hrabovszky E.** (2008) Cholinergic afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons of the rat. *Neurochem. Int.*: 52 (4-5):723-728
- (17) **Hrabovszky E.** and Liposits Z. (2008) Novel aspects of glutamatergic signalling in the neuroendocrine system *J. Neuroendocrinol.*: 20 (6): 743-751
- (18) Varju P., 1, Ken Chang, C.N. **Hrabovszky E.**, Merchenthaler I. and Liposits Z. (2009) Temporal profile of estrogen-dependent gene expression in LHRH-producing GT1-7 cells. *Neurochem. Int.*: 54(2) 119-134
- (19) Sarvari M., **Hrabovszky E.**, Kalló I., Galamb O., Solymosi N., Liko I., Molnar B., Tihanyi K., Szombathelyi Z., Liposits Z. (2010) Gene expression profiling identifies key estradiol targets in the frontal cortex of the rat. *Endocrinology*: 151(3):1161-1176
- (20) Kocsis Z.S., Molnár C.S., Watanabe, M., Daneels G., Moechars D., Liposits Z. and **Hrabovszky E.** (2010) Demonstration of vesicular glutamate transporter-1 in corticotroph cells in the anterior pituitary of the rat. *Neurochem. Int.*: 56(3):479-486
- (21) **Hrabovszky E.**, Ciofi P., Vida B., Horvath M.C., Keller É., Caraty A., Bloom S.R., Ghatei M.A., Dhillo W.S., Liposits Z. and Kalló I. (2010) The kisspeptin system of the human hypothalamus. Sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur. J. Neurosci.*: 31:1984-1998
- (22) Sarvari M., Kalló I., **Hrabovszky E.**, Solymosi N., Toth K., Likó I., Molnar B., Tihanyi K. and Liposits Z. (2010) Estradiol replacement alters expression of genes related to neurotransmission and immune surveillance in the frontal cortex of middle-aged ovariectomized rats. *Endocrinology*: 151: 3847-3862
- (23) Farkas I., Kalló I., Deli L., Vida B., **Hrabovszky E.**, Fekete C., Moenter S.M., Watanabe M. and Liposits Z. (2010) Retrograde Endocannabinoid Signaling Reduces GABA-ergic Synaptic Transmission to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Endocrinology*: (In press)

### VI/3 A PHD FOKOZAT MEGSZERZÉSE ÓTA MEGJELENT EGYÉB SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

- (1) Wittman G., Sarkar S., **Hrabovszky E.**, Liposits Z., Lechan R.M. and Fekete C. (2004): Galanin but not galanin-like peptide (GALP)-containing axon terminals innervate hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH)-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res.*: 1002: 43-50
- (2) Kalamatianos T., van der Walt L., **Hrabovszky E.**, Kalló I., Marsh P., Bennett N.C. and Coen C.W. (2005): Characterization of gonadotrophin releasing hormone precursor cDNA in the old world mole-rat cryptomys hottentotus pretoriae: high homology with the new world guinea pig sequence. *J. Neuroendocrinol.*: 17(5): 265-268
- (3) **Hrabovszky E.**, Halász J., Meelis W., Kruk M.R., Liposits Z., Halász J. (2005): Neurochemical characterization of hypothalamic neurons involved in attack behavior: glutamatergic dominance and co-expression of thyrotropin-releasing hormone in a subset of glutamatergic neurons. *Neuroscience*: 133(3): 657-666
- (4) Menyhért J., Wittmann G., **Hrabovszky E.**, Keller É., Liposits Zs. and Fekete Cs. (2006): Interconnection between orexigenic neuropeptide Y- and anorexigenic  $\alpha$ -

- melanocyte stimulating hormone-synthesizing neuronal systems of the human hypothalamus. **Brain Res.**: 1076(1):101-105
- (5) Menyhért J., Wittmann G., **Hrabovszky E.**, Szlávik N., Keller É., Horváth T.L., Tschöp M.H., Liposits Zs. and Fekete Cs. (2006): Distribution of ghrelin-immunoreactive neuronal networks in the human hypothalamus. **Brain Res.**: 1125(1):31-36
  - (6) Halasz J., Toth M., Mikics E., **Hrabovszky E.**, Barsy B., Barsvari B. and Haller J. (2008): The effect of NK1 receptor blockade on territorial aggression and in a model of violent aggression. **Biol. Psychiatry**: 63(3): 271-278
  - (7) Kiss J., Halász, B., Csáki Á., Liposits Z. and **Hrabovszky E.** (2007) Vesicular glutamate transporter 2 protein and mRNA containing neurons in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of the rat. **Brain Res. Bull.**: 74: 397-405
  - (8) Kalló I., Jekkel C., **Hrabovszky E.**, Jurányi Z., Vida B., Járasi A., Wilhelm T., Harsing L.G., Jr. and Liposits Z. (2007) Immunohistochemical and *in situ* hybridization studies on glycine transporter 1 after transient ischemia in the rat forebrain. **Neurochem. Int.**: 52 (4-5): 799-808
  - (9) Farkas I., Varju P., Szabo E., **Hrabovszky E.**, Okada N., Okada H. and Liposits Z. (2008) Estrogen enhances expression of the complement C5a receptor and the C5a-agonist evoked calcium influx in hormone secreting neurons of the hypothalamus. **Neurochem. Int.**: 52 (4-5): 846-856
  - (10) Csercsik D., Farkas I., Szederkenyi G., **Hrabovszky E.**, Liposits Z. and Hangos K. (2010) The Hodgkin-Huxley type modelling and parameter estimation of GnRH neurons. **Biosystems**: 100(3):198-207
  - (11) Vida B., **Hrabovszky E.**, Kalamatianos T., Coen C.W., Liposits Z. and Kalló I. (2008) Oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in the suprachiasmatic nucleus of the male and female mice **J. Neuroendocrinol.**: 20(11): 1270-1277
  - (12) Vida B., Deli L., **Hrabovszky E.**, Kalamatianos T., Caraty A., Coen C.W., Liposits Z. and Kalló I. (2010) Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurons innervating kisspeptin neurons in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen **J. Neuroendocrinol.**: 22(9):1032-1039

#### VI/4 SZCIENTOMETRIAI ADATOK (AZ ÉRTEKEZÉS BENYÚJTÁSAKOR)

Elfogadott közlemények száma: **43**

Összesített impakt faktor: **150,233**

Összes citáció: **779**

Független citáció: **646**

#### VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kutatói pályám elindításáért és további támogatásáért Liposits Zsolt professzor úrnak szeretnék köszönetet mondani.

Az *in situ* hibridizációs módszer elsajátítására Sandra L. Petersen laboratóriumában töltött posztdoktori éveim során kaptam lehetőséget.

Hálás vagyok az Endokrin Neurobiológia Laboratórium valamennyi volt és jelenlegi tagjának az alkotó és pozitív szakmai légkör megteremtéséért, köztük Kalló Imre, Fekete Csaba, Gereben Balázs, Hajszán Tibor, Farkas Imre, Sárvári Miklós, Túri Gergely, Wittmann Gábor és Molnár Csilla kollégáimnak, továbbá a munkámat támogató, magas színvonalú asszisztensi segítségért Bekó Norbertnének. Munkakapcsolatom a Semmelweis Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetében Dr. Keller Éva professzor asszonnyal a humán szövettani vizsgálatok elvégzését tette lehetővé.

Szüleimnek köszönöm kitartó támogatásukat és szeretetüket.